

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *lsp* Y  
*tatC* IMPLICADOS EN LA MADURACIÓN Y  
PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS  
SECRETADAS EN *Streptomyces lividans*.**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTHER ISABEL GARCÍA ARRANZ**

**Madrid 2011**

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *lsp* Y  
*tatC* IMPLICADOS EN LA MADURACIÓN Y  
PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS  
SECRETADAS EN *Streptomyces lividans*.**

**Memoria presentada para optar a grado de Doctor por:**

**ESTHER ISABEL GARCÍA ARRANZ**

**Director de Tesis: Rafael Pérez Mellado.**

**Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.**

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología.



## ABREVIATURAS

A	Amperios.
aa	Aminoácido/s.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADP	Adenina difosfato.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenina trifosfato.
BLAST	<i><u>B</u>asic <u>L</u>ocal <u>A</u>lignment <u>S</u>earch <u>T</u>ool</i>
BSA	Albúmina de suero bovino.
°C	Grados centígrados.
col.	Colaboradores.
DNS	Ácido dinitrosalicílico.
DOC	Ácido deoxicólico.
dNTP	Didexoinucleótidos.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DTT	1,4- Ditioneitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
FC	<u>F</u> old <u>C</u> hange.
Fig	Figura.
G+C	Guaninas y citosinas.
GTP	Guanosina trifosfato.
HRP	Enzima peroxidasa de rábano.
kb	Kilobases.
kDa	Kilodalton.
LB	Luria Bertani
M	Molar.
Mb	Megabases.
mg	Miligramos.
mM	Milimolar.
min	Minutos.
mm	Milímetro.
nm	Nanómetro.
nt	Nucleótidos.
oligo	Oligonucleótido.
P	Promotor.
PBS	Tampón fosfato salino.
pi	Fósforo inorgánico.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PS	Péptido señal.
ppGpp	Guanidina polifosfato.
p/v	Peso/volumen.
qRT-PCR	Retrotranscripción+PCR cuantitativa.
rpm	Revoluciones por minuto.
Sec	Ruta mayoritaria de Secreción
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS ( <i><u>S</u>DS-<u>P</u>oly<u>a</u>crilamida <u>G</u>el <u>E</u>lectrophoresis</i> )
SRP	Partícula reconocedora de señal, de sus siglas en inglés “ <u>s</u> ignal <u>r</u> ecognition particle”.

Tat	Transporte de proteínas con dos argininas, de sus siglas en inglés “ <u>t</u> win <u>a</u> rginine <u>t</u> ransport”.
TCA	Ácido Tricloroacético
Tris	Tris-2-amino-2(hidroximetil)1,3 propanodiol.
U	Unidades enzimáticas.
µg	Microgramos.
µl	Microlitros.
V	Voltios.
v/v	Volumen/volumen.

## ÍNDICE

## ÍNDICE

<b>SUMMARY</b>	1
<b>INTRODUCCION</b>	2
1. Visión general del género <i>Streptomyces</i>	2
2. <i>Streptomyces lividans</i> como bacteria secretora de proteínas extracelulares	4
3. La maquinaria de secreción en <i>Streptomyces</i> : la ruta Sec	5
3.1. Mecanismo general de secreción Sec	5
3.2. Foldasas	7
3.3. Peptidasas señal tipo II	9
4. La maquinaria de secreción en <i>Streptomyces</i> : la ruta Tat	10
4.1. Péptido señal Tat	11
4.2. Mecanismo general de secreción Tat	13
<b>OBJETIVOS</b>	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
1. MATERIALES	17
1.1. Cepas bacterianas	17
1.2. Plásmidos	17
1.3. Reactivos	19
1.4. Medios de cultivo	20
1.5. Juegos comerciales para la extracción y purificación de ADN	21
2. MÉTODOS	21
2.1. Condiciones de cultivo y conservación de cepas	21
2.2. Purificación de ácidos nucleicos	23
2.3. Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
2.4. PCR cuantitativa en tiempo real	25
2.5. Hibridación y procesado de micromatrices	27
2.6. Transformación génica	27
2.7. Construcción de cepas sobreproductoras y mutantes	27

2.8. Ensayos de proteínas	30
2.9. Electroforesis de proteínas y ensayos de Western-blot	32
2.10. Microscopía y obtención de imágenes	33
<b>RESULTADOS</b>	34
1. Construcción y caracterización de la cepa mutante en el gen <i>lsp</i> de <i>S. lividans</i> TK21	34
1.1. Identificación y clonaje de <i>lsp</i>	34
1.2. Construcción de la cepa mutante en el gen <i>lsp</i>	34
1.3. Caracterización de la cepa mutante	35
1.4. Análisis de proteínas extracelulares mediante electroforesis bidimensional	36
1.5. Estudio transcripcional del mutante $\Delta$ <i>lsp</i>	37
1.6. Construcción de la cepa sobreproductora del gen <i>lsp</i>	42
2. Rutas de secreción Sec y Tat	43
2.1. Construcción y caracterización de la cepa mutante en el gen <i>tatC</i> de <i>S. lividans</i> TK21	43
2.2. Utilización de la ruta Tat	46
3. FkpA como foldasa de agarasa	51
<b>DISCUSIÓN</b>	53
1. Respuesta celular a la depleción del gen <i>lsp</i>	53
2. Secreción de agarasa por las rutas Tat y Sec	56
<b>CONCLUSIONES</b>	59
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	60



## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> .	3
<b>Figura 2.</b>	Modelo de secreción para <i>S. lividans</i> .	6
<b>Figura 3.</b>	A) Representación tridimensional de la proteína FKBP12 humana unida al inmunosupresor FK506, al que deben su nombre las FKBP. B) Representación tridimensional de la proteína PrsA de <i>B. subtilis</i> .	9
<b>Figura 4.</b>	Modelo general de la estructura y topología de membrana de la peptidasa señal tipo II de bacterias, tomado de Paetzel y col; 2002.	10
<b>Figura 5.</b>	Ejemplo de péptido líder típico de las proteínas que van a ser translocadas por la ruta Tat.	12
<b>Figura 6.</b>	La maquinaria Tat en <i>S. lividans</i>	15
<b>Figura 7.</b>	Alineamiento de la proteína Lsp, codificada por el gen <i>lsp</i> de <i>S. lividans</i> con la correspondiente en <i>B. subtilis</i> . SLI2074 corresponde a la proteína Lsp de <i>S. lividans</i>	34
<b>Figura 8.</b>	A) Crecimiento en medio sólido MS de las cepas TK21, $\Delta$ <i>lsp</i> , y complementado, $\Delta$ <i>lsp</i> [pIJ- <i>lsp</i> ]. B) Crecimiento de TK21 frente a $\Delta$ <i>lsp</i> en medio mínimo definido NMMP (izquierda) y comparación del crecimiento de TK21 conteniendo el plásmido pIJ487 sin inserto y el gen <i>lsp</i> clonado en pIJ487 (derecha).	35
<b>Figura 9.</b>	Secretoma correspondiente a las 24 horas de crecimiento de TK21 (A) y $\Delta$ <i>lsp</i> (B). El marcador de tamaños moleculares expresado en kDa se indica en el margen izquierdo de cada gel.	36
<b>Figura 10.</b>	Porcentaje de actividad residual de subtilisina después de incubación con los extractos de sobrenadantes de los cultivos de TK21 y $\Delta$ <i>lsp</i> a lo largo del crecimiento.	37
<b>Figura 11.</b>	Actividad residual de subtilisina en $\Delta$ <i>lsp</i> [pIJ <i>lsp</i> ] y en TK21[pIJ <i>lsp</i> ].	42
<b>Figura 12</b>	Crecimiento en medio sólido MS de las cepas TK21 y $\Delta$ <i>tatC</i> tras 5 días de incubación a 30°C.	44
<b>Figura 13.</b>	Representación del crecimiento de TK21 frente a $\Delta$ <i>tatC</i> en medio NMMP	45
<b>Figura 14.</b>	A) Híbrido pFDx <i>lnC</i> . B) Secreción de xilanasa a las 24, 36 y 48 horas de crecimiento en la cepa silvestre, en $\Delta$ <i>secG</i> y en $\Delta$ <i>tatC</i> . Los tiempos 60, 72 y 84 de $\Delta$ <i>tatC</i> corresponden a las 24, 36 y 48 de TK21 y $\Delta$ <i>secG</i> . PS: péptido señal. P: promotor	46
<b>Figura 15.</b>	(A) pAMI11 y secreción de $\alpha$ -amilasa. (B) pAGAs5 y secreción de agarasa (C) Híbrido pAGA502 y secreción de agarasa dirigida por el péptido señal de $\alpha$ -amilasa. (D) pAMI2003 y secreción de $\alpha$ -amilasa dirigida por el péptido señal de agarasa. En los cuatro casos de secreción de las proteínas modelo se detectan en las cepas silvestre, $\Delta$ <i>secG</i> y $\Delta$ <i>tatC</i> . PS: péptido señal. P: promotor. Los tiempos 60, 72 y 84 de $\Delta$ <i>tatC</i> corresponden a 24, 36 y 48 de la cepa silvestre y del mutante $\Delta$ <i>secG</i> .	48
<b>Figura 16.</b>	Porcentaje de actividad agarasa detectada en las cepas TK21[pAGAs5] (TK21) y $\Delta$ <i>tatC</i> [pAGAs5] ( $\Delta$ <i>tatC</i> ). Tiempos 24, 36 y 48 horas de TK21 corresponden a 60, 72 y 84 horas de la cepa mutante isogénica.	49
<b>Figura 17.</b>	Ensayo de agarasa en placa.	50

<b>Figura 18.</b>	Alineamiento del producto del gen <i>fkpA</i> (SLI1639) de <i>S. lividans</i> con sus equivalentes en <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i>	51
<b>Figura 19.</b>	Representación de la actividad agarasa en el sobreproductor de dicha enzima que lleva el gen <i>fkpA</i> en multicopia para favorecer su plegamiento.	52

## ÍNDICE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Cepa bacterianas de <i>E. coli</i> utilizada	17
<b>Tabla 2</b>	Cepas bacterianas de <i>Streptomyces</i> utilizadas	17
<b>Tabla 3</b>	Plásmidos con origen de replicación en <i>Escherichia coli</i> .	18
<b>Tabla 4</b>	Plásmidos con origen de replicación en <i>Streptomyces</i>	18-19
<b>Tabla 5</b>	Oligonucleótidos utilizados en la técnica Redirect	25
<b>Tabla 6</b>	Oligonucleótidos utilizados para amplificación de <i>fkpA</i> y <i>lsp</i>	25
<b>Tabla 7</b>	Oligonucleótidos empleados en el estudio de qRT-PCR.	26
<b>Tabla 8</b>	Genes regulados positivamente en la cepa mutante <i>lsp</i> (24 horas)	38
<b>Tabla 9</b>	Genes regulados negativamente en la cepa mutante <i>lsp</i> (24 horas)	39-41
<b>Tabla 10</b>	Genes afectados en la cepa mutante <i>lsp</i> (24 horas).	42

## SUMMARY

## SUMMARY

*Streptomyces lividans* is a soil-dwelling Gram positive bacterium that secretes and produces many extracellular proteins (Gilbert *et al.*, 1995), and has been used as a host for the secretory production of heterologous proteins (Gilbert *et al.*, 1995; Van Mallaert and Anné, 1994). The study of its secretion mechanisms arouses great interest with a view to a potential improvement in industrial protein production.

Two main secretory pathways have been described in *Streptomyces*, Sec and Tat route where the secretion of proteins occurs in an unfolded and folded state, respectively. Once the proteins have been translocated, their signal peptides are cleaved by means of the appropriate signal peptidase. Proteins that are not secreted in a properly folded manner use the major route of protein secretion (Sec) and require foldases to obtain their final active conformation. The gene *fkpA* (SLI1639), encodes FkpA, a FKBP-type foldase, which is processed by Lsp, a signal peptidase II. Depletion of the *lsp* gene in *S.lividans* causes a transient activation of the stringent response as well as a reduction of the transcriptional level of genes encoding extracellular proteins. This temporary malfunction is corrected at the late stages of bacterial growth.

Proteins using the Tat alternative route are secreted fully folded and functionally active. A mutant in one of the Tat components, TatC, was constructed and the model proteins,  $\alpha$ -amilase, agarase and xylanase C were used to evaluate the consequences of *tatC* depletion. Tat and Sec mature proteins were fused to Sec or Tat signal peptides respectively. Hence, the secretion of agarase by both routes was confirmed albeit at a different level, FkpA being required for the correct extracellular folding of the agarase secreted via Sec.

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

### 1.- VISIÓN GENERAL DEL GÉNERO *Streptomyces*

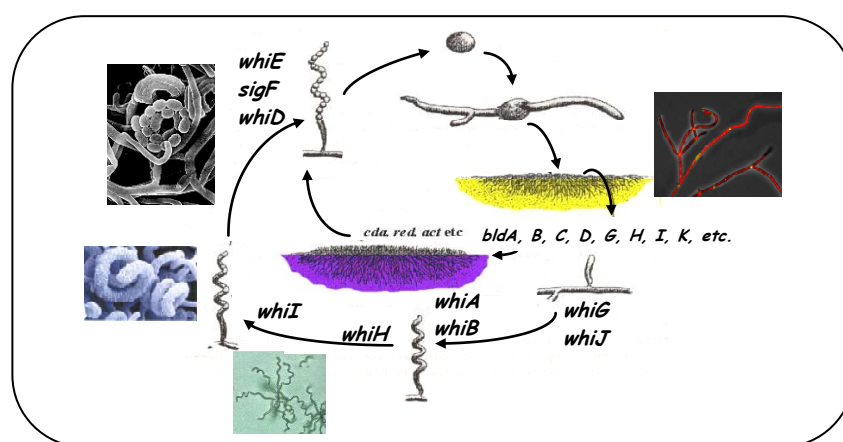
Dentro de los actinomicetos, se encuentra el género de bacterias Gram positivas *Streptomyces*, bacterias aerobias con un micelio filamentosos muy parecido al de los hongos. Aunque son bacterias ubicuas en la naturaleza (Keiser y col., 2000), habiéndose detectado incluso en lechos marinos (Zhong y col., 2002), su hábitat natural es el suelo, donde liberan gran cantidad de enzimas hidrolíticas desempeñando así un importante papel en la degradación de diverso material orgánico (Gilbert y col., 1995), siendo fácilmente identificables por el característico olor a tierra húmeda que le confiere la producción de geosmina (Gust y col., 2003).

El genoma de *Streptomyces coelicolor*, el primer estreptomiceto cuyo genoma fue secuenciado, es lineal, con un tamaño de 8Mb (Bentley y col., 2002), el doble que el de otras bacterias como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* (Blattner y col., 1997), y posee un elevado contenido en G+C de aproximadamente 73% (Madigan y col., 1999; Williams y col., 1989; Bentley y col., 2002). *S. coelicolor* contiene en su genoma varias agrupaciones génicas para la síntesis de antibióticos y sus respectivos genes reguladores. Dentro del género *Streptomyces*, *S. coelicolor* es la especie más estudiada, y está considerada como el paradigma de los estreptomicetos.

Los estreptomicetos poseen también sensores por los cuales perciben cambios en su ambiente (nutrientes, temperatura, presión osmótica, etc.) que activan la entrada en funcionamiento de mecanismos que les permiten adaptarse de una forma rápida y efectiva a dichos cambios. Como parte de esa adaptación se encuentra la capacidad de sintetizar un gran número de enzimas degradativas (xilanasas, quitinasas, proteasas, hemicelulasas, etc.; Gilbert y col., 1995), considerada como una ventaja adaptativa que les permite competir con otros organismos del mismo hábitat, facilitándoles la colonización y diseminación en el mismo (Gauthier y col., 2005).

Los estreptomicetos poseen un complejo ciclo de vida que implica profundos cambios morfo-fisiológicos coordinados. Se inicia con la germinación de una espora mononucleada cuando las condiciones ambientales son adecuadas, activándose el metabolismo celular (síntesis de ARN, síntesis de proteínas). A la par que se sintetiza el

ADN genómico, surge el tubo germinativo a partir de la espora, desarrollándose al final de éste una pared celular. La etapa continúa con rápidas replications cromosómicas en el tubo germinativo y su crecimiento y ramificación. Estas ramificaciones comienzan a septarse en la parte más alejada de la zona de crecimiento dando lugar a una compleja red de hifas que forman el denominado micelio sustrato y que es capaz de penetrar en el medio al que está anclado gracias a las enzimas hidrolíticas secretadas. Conforme avanza la maduración de la colonia, se dispara un estrés fisiológico por la insuficiencia de nutrientes (Takano y Bibb, 1994; Chakraborty y col., 1997) provocando una cascada de señales de activación de genes implicados en la formación del micelio aéreo como son los genes *bld* (Willey y col., 1993). Este micelio de nueva formación, está constituido por hifas de superficie hidrofóbica y se nutre a partir de los productos derivados de la degradación del micelio sustrato por enzimas hidrolíticas (Chater 1984), estableciéndose un gradiente de nutrientes que difunden desde la base. En las siguientes fases del ciclo, las hifas aéreas sufren múltiples divisiones celulares altamente organizadas para generar largas cadenas de esporas que serán liberadas al medio, cerrando así el ciclo biológico (Fig. 1, tomada de Keiser y col., 2000).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces*.** Se señalan los genes que intervienen en el proceso de diferenciación. En amarillo está representado el micelio sustrato y en morado el micelio aéreo desarrollado por encima del micelio sustrato. Las imágenes muestran el detalle microscópico, óptico o electrónico dependiendo del caso, de las hifas a lo largo del ciclo.

Por lo general, la diferenciación morfológica iniciada tras el desarrollo vegetativo determina la activación de los genes responsables de la producción de lo que se ha dado en llamar metabolitos secundarios (Champness y Chater, 1994), que han mostrado ser de utilidad a nivel industrial, agrícola o en salud humana y animal, como

los antibióticos, representando dos tercios de los antibióticos de origen microbiano existentes (Miyadoh, 1993), y una amplia gama de compuestos con actividad antitumoral o antiviral, herbicidas (Seto y col., 1983), antiparasitarios (Ikeda y col., 1987) y enzimas degradativas (Gilbert y col., 1995).

## **2.- *Streptomyces lividans* COMO BACTERIA SECRETORA DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES**

Tradicionalmente *Escherichia coli* ha sido la bacteria más ampliamente utilizada para la producción de proteínas heterólogas a gran escala debido al vasto conocimiento de su genética y fisiología, facilidad en su manejo, así como la gran disponibilidad de herramientas de ingeniería genética que permiten obtener una elevada expresión de los genes clonados en esta bacteria. No obstante, presenta ciertas desventajas de las cuales, la más destacada es el hecho de que, con frecuencia, las proteínas expresadas se acumulan en el citoplasma formando cuerpos de inclusión, y la existencia de un espacio periplásmico también dificulta la recuperación de proteínas extracelulares en el medio de crecimiento (Pimienta y col., 2005, Pimienta y col., 2007). Las bacterias Gram positivas, carentes de espacio periplásmico, secretan las proteínas directamente al medio extracelular, lo que finalmente permitiría una purificación más efectiva de las proteínas secretadas. Especies de los géneros *Bacillus* (*B. brevis*, *B. subtilis*) y *Lactococcus* (*L. lactis*) han sido empleadas para este fin (Nakashima y col., 2005).

Los géneros de actinomicetos, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, y *Corynebacterium* también han recibido atención como potenciales sistemas anfitriones para la producción de proteínas recombinantes, debido a su diversidad metabólica única y su maquinaria enzimática, que permite la obtención de metabolitos secundarios de valor industrial y médico, procesos de bioconversión y aminoácidos por procesos de fermentación, así como enzimas de interés (Nakashima y col., 2005). En el género *Streptomyces*, se encuentran muchas especies que se caracterizan por ser grandes secretoras naturales de proteínas. Dentro de las especies de *Streptomyces*, *S. lividans*, cuyo genoma es prácticamente idéntico al de *S. coelicolor* ([www.broadinstitute.org](http://www.broadinstitute.org)), no está considerada como especie patógena para los humanos (Kieser y col., 2000) y no se ha descrito la formación de cuerpos de inclusión en su citoplasma. Al mismo tiempo, cuenta con la ventaja de presentar una baja actividad de endonucleasas de restricción de ADN, lo que



permite una más fácil manipulación genética a la hora de emplearla como bacteria anfitriona en la producción de proteínas citoplasmáticas y de secreción tanto homólogas como heterólogas (Binnie y col., 1997). Todas estas cualidades la convierten en una muy útil estirpe a nivel industrial. De ahí que sea interesante profundizar en el estudio de su maquinaria de secreción, indagando en los pasos limitantes de los mecanismos de transporte, translocación y secreción de proteínas al exterior celular.

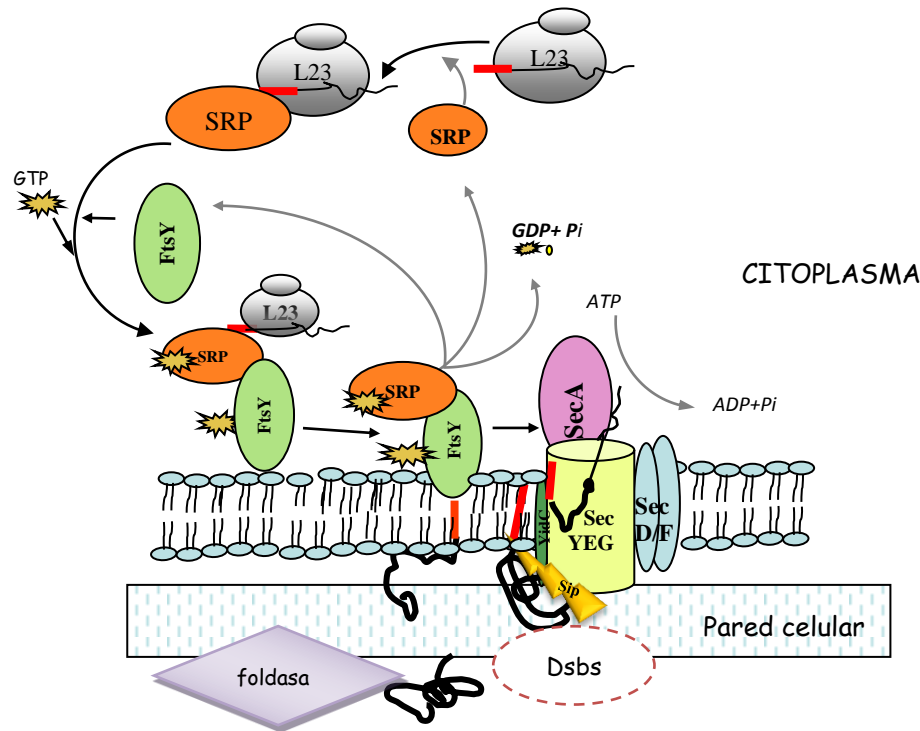
### **3.- LA MAQUINARIA DE SECRECIÓN EN *Streptomyces*: LA RUTA SEC**

Las proteínas que van a ser secretadas, se sintetizan con una extensión de la cadena polipeptídica en el extremo amino terminal denominada péptido líder o péptido señal, que ayuda a diferenciarlas de otras proteínas y que va a ser la señal específica que las dirigirá en su entrada en la ruta de secreción. La proteína extracelular de nueva síntesis es transportada a la membrana celular donde es presentada al conjunto de proteínas que componen el translocón (o complejo translocasa) para iniciar su translocación al exterior celular. Durante el proceso de translocación, o inmediatamente después, el péptido señal es eliminado por la peptidasa señal. Esta vía de secreción implica que las proteínas precursoras van a translocarse en su forma desplegada (Danese y col., 1998) siendo, una vez en el exterior, ayudadas por proteínas con función plegadora (foldasas) para adquirir su configuración activa.

#### **3.1.- Mecanismo general de secreción Sec**

La ruta Sec es la más comúnmente empleada por la gran mayoría de las proteínas que van a ser translocadas. El proceso de secreción está constituido por una maquinaria producto de los genes *sec* (Pugsley, 1993), y de forma general, se puede dividir en tres pasos (Fig.2).

Varios componentes intracelulares reconocen e interaccionan con las secuencias amino terminales, como es la chaperona SecB en el caso de *E. coli* (Fekkes y col., 1998), o la partícula reconocedora de señal, SRP (de Gier y col., 1996; Koch y col., 1999), u otras chaperonas (van Wely y col., 2001), que reconocen a la proteína precursora, que está en una conformación desplegada, manteniéndola en esa conformación evitando su agregación intracelular.



**Figura 2. Modelo de secreción para *S. lividans*.** En ausencia de SecB, SRP dirige proteínas de secreción a la membrana, interaccionando con su receptor, FtsY para asociar el complejo a la membrana. Posteriormente, se produciría la transferencia de la cadena polipeptídica al translocón mediada por SecA, SRP y FtsY, se disociarían y la proteína se translocaría a través del canal de membrana. Finalmente se escindiría el péptido líder por acción de la peptidasa señal Sip correspondiente y la proteína en su forma madura pasaría al espacio extracelular, donde la foldasa se encargaría de plegarla correctamente.

En un segundo paso, se produce la transferencia de la cadena polipeptídica, mediada por la acción de SecA a la maquinaria de membrana, esto es, a las proteínas asociadas que forman el translocón o translocasa, y su transporte al exterior celular (Economou y Wickner, 1994). Este proceso se ha denominado translocación. La energía necesaria para el proceso de translocación viene aportada por la energía liberada en la hidrólisis de trinucleótidos, y por la fuerza protón-motriz de membrana (de Keyzer y col., 2003). El canal de membrana por el que van a ser transportadas las proteínas al exterior celular posee una arquitectura conservada en bacterias, archaea y eucariotas (Pohlschröder y col., 1997). Es un poro con actividad pasiva en la translocación, que permite el paso de la cadena polipeptídica de forma desplegada a través de la membrana gracias a la energía que aportan las proteínas asociadas y la fuerza derivada del potencial de membrana (Osborne y col., 2005). En *E. coli*, los componentes principales

del complejo de translocación se localizan en la membrana. Se trata de tres proteínas principales, SecY, SecE, y SecG, (exclusiva de bacterias; Pohlschröder y col., 2005), a las que acompañan otras proteínas asociadas, SecD, SecF, YldC, que forman un trímero, e YajC. En la maquinaria del translocón también puede incluirse SecA, proteína que desempeña un papel primordial en la secreción proteica bacteriana por su capacidad para hidrolizar ATP aportando la energía necesaria para el proceso de translocación y transfiriendo la proteína extracelular desde SecB al translocón. En *Streptomyces lividans* se han localizado homólogos para los genes SecY (Ostiguy y col., 1996), SecE (Kim y col., 1997), SecG (Palomino y Mellado., 2008), SecA (Gilbert y col., 1996; Blanco y col., 1996), SecD y SecF (Martínez-Costa y col., 1996). Sin embargo, hay que destacar la ausencia de homólogo del gen *secB* (Bentley y col., 2002), habiéndose descrito que SRP reemplaza su función (Palomino y Mellado, 2005).

Como paso final, se produce la escisión del péptido líder por parte de una peptidasa señal una vez translocada la proteína. Mientras que *E. coli* únicamente posee una peptidasa señal tipo I, en *Streptomyces* existen cuatro, SipW, SipX, SipY, cuyos genes se sitúan en el mismo operón, y SipZ, cuyo gen es el primero de un operón diferente (Palacín y col., 2002). En *Bacillus subtilis* se han descrito hasta 5 genes *sip* en su genoma y dos en su plásmido (Tjalsma y col., 1999). Una de las características de *Streptomyces* es que cuenta con unos péptido líderes con un tamaño que oscila alrededor de 35 aminoácidos (Gilbert y col., 1995), mientras que en otras bacterias Gram positivas la media está en 32 aminoácidos de longitud frente a los 24 de las Gram negativas (Bendtsen y col., 2004). Los péptidos líderes de las bacterias Gram positivas presentan un mayor número de aminoácidos básicos (K/R) en la región amino terminal del péptido líder (Nielsen y Krogh, 1998).

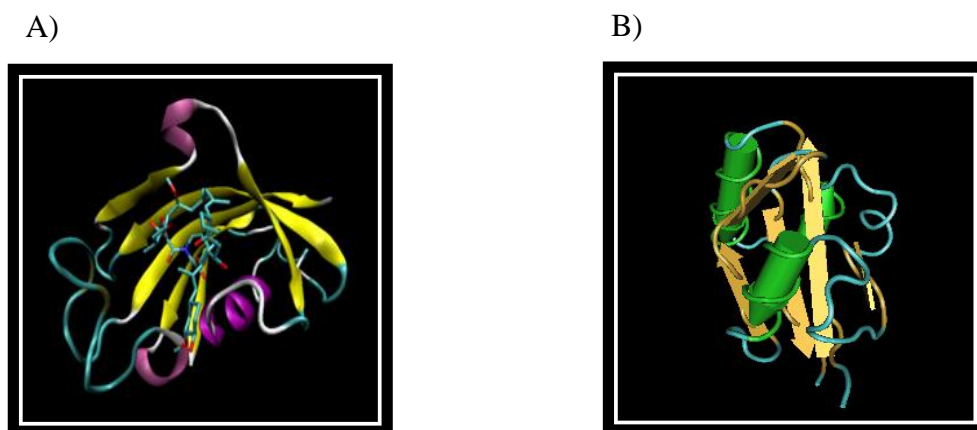
### **3.2.- Foldasas**

El correcto plegamiento extracelular de muchas proteínas secretadas no es espontáneo y va a depender de la presencia y acción de ciertas proteínas que les permiten adquirir la conformación correcta y que se conocen con el nombre genérico de foldasas. En *E. coli* se han descrito peptidil prolil cis/trans isomerasas (PPIasas, Rahfeld y col., 1994). La proteína PrsA de *B. subtilis* es una lipoproteína unida a la cara

extracelular de la membrana que participa en el plegamiento post-traducciona de las proteínas exportadas y que las estabiliza en el compartimento existente entre la membrana plasmática y la pared celular (van Wely 2000). PrsA, con un péptido líder tipo II, tiene cierta similitud en la secuencia con una peptidil prolil cis/trans isomerasa de *E. coli*, indicando que puede pertenecer a esta familia de chaperonas y muestra actividad PPIasa dependiente de su dominio parvulina. Se ha demostrado que este dominio, así como los dominios amino y carboxilo terminales son esenciales para la función *in vivo* de PrsA en la secreción de proteínas (Vitikainen y col., 2004).

Las PPIasas son un grupo de proteínas ubicuas caracterizadas por su actividad peptidil-prolil cis/trans isomerasa que cataliza la reacción de interconversión de los isómeros cis/trans en el residuo prolina de los enlaces peptídicos. La importancia de esta reacción radica en que puede ser un factor limitante en cuanto a velocidad de plegamiento se refiere ya que esta isomerización no suele ser espontánea (Fischer y col., 1984; Lang y col., 1987; Lin y col., 1988; Davis y col., 1989; Kiefhaber y col., 1990; Freskgard y col., 1992; Tan y col., 1997; Yang y col., 1997). Entre las proteínas con esta actividad encontramos tres subfamilias, ciclofilinas (Rahfeld y col., 1996), parvulinas (Harding y col., 1989) y FKBP, acrónimo del inglés FK506-Binding Proteins (Rahfeld y col., 1994), una familia de proteínas con actividad peptidil-prolil isomerasa relacionadas con las ciclofilinas en su función aunque no en secuencia (Siekierka y col., 1989).

En el genoma de *S. lividans* se ha identificado un gen análogo al gen *SCO1639* (*fkpA*) de *S. coelicolor* que codifica una lipoproteína tipo FKBP, ortóloga a FKBP33 de *S. chrysomallus* (Pahl y Keller., 1994), incluida en la familia de las PPIasas. En base a su estructura y función, las FKBP de *Streptomyces* se sitúan evolutivamente cerca de las equivalentes enzimas eucarióticas (Pahl y col., 1992).



**Figura 3.** A) Representación tridimensional de la proteína FKBP12 humana unida al inmunosupresor FK506, al que deben su nombre las FKBP. B) Representación tridimensional de la proteína PrsA de *B. subtilis*.

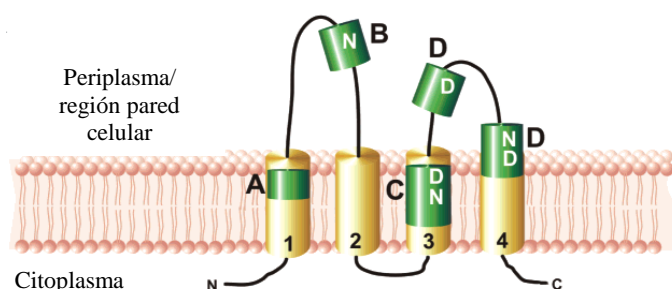
### 3.3.- Peptidasas señal tipo II

La peptidasa señal tipo II es específicamente requerida para el procesamiento de las pre-lipoproteínas. Las lipoproteínas son una clase de proteínas translocadas a través de la membrana citoplásmica, cuyo péptido señal es de tipo II. La principal diferencia respecto a otros reside en la secuencia que los péptidos señal tipo II presentan, esencial para el correcto procesamiento de la lipoproteína, llamada “lipobox”, y en la que está presente un residuo de cisteína invariable en el sitio de corte para la escisión del péptido señal (Hayashi y col., 1990; Rahman y col., 2008). Este residuo de cisteína es concretamente reconocido por la peptidasa señal II y es el sitio de acción de la enzima Lgt (del inglés Lipoprotein diacylglycerol transferase), quien le adiciona residuos de diacilglicerol para el anclaje de la proteína madura en la membrana (Sankaran y col., 1995).

En contraste con las peptidasas señal tipo I, *B. subtilis*, así como la mayoría de los organismos entre los que se incluye *Streptomyces*, contiene un único gen para una peptidasa señal tipo II, denominado *lsp* (Prágai y col., 1997). El producto de este gen, la proteína Lsp, es esencial en bacterias Gram negativas aunque en todas las bacterias Gram positivas analizadas hasta la fecha, la ausencia de Lsp ha resultado no ser esencial a pesar de la existencia de lipoproteínas que no son dispensables (Leskelä y col., 1999;

Thompson y col., 2010). En *S. coelicolor* se ha identificado el gen *SCO2074* como secuencia codificante para una peptidasa señal tipo II, designada Lsp.

Todas las Lsp son proteínas integrales de membrana con cuatro segmentos transmembranales cuyos extremos amino y carboxilo terminales se encontrarían hacia el citosol (Muñoa y col., 1991; Prágai 1997; Tjalsma y col., 1999). El sitio activo de estas enzimas está formado por dos residuos de ácido aspártico localizados en la proximidad de la cara citoplasmática de la membrana de manera similar al sitio activo con un residuo de serina en las SPasas tipo I (Tjalsma y col., 1999).



**Figura 4.** Modelo general de la estructura y topología de membrana de la peptidasa señal tipo II de bacterias tomado de Paetzel y col; 2002. Se señalan los dominios conservados con A, B, C y D.

Las Lsp estudiadas de algunos actinomicetos contienen una región N-terminal ausente en otras bacterias (Thompson y col., 2010). Esta región, supuestamente citoplasmática, precede a la primera hélice transmembrana, sugiriendo que podría interactuar con otra región C-terminal que se ha encontrado en las enzimas Lgt de los actinomicetos cuya acción sobre la lipoproteína que se va a translocar ha tenido lugar en un paso previo a la escisión del péptido líder por Lsp (Rezwan y col., 2007; Sutcliffe y Hutchings., 2007).

En estudios recientes se ha llegado a la conclusión de que esta región amino terminal común de las Lsp es requerida para su actividad, al menos en la enzima Lsp de *S. coelicolor* (Thompson y col., 2010), lo que hace suponer que en *S. lividans*, dada su cercanía filogenética, ocurriría lo mismo.

#### 4.- LA MAQUINARIA DE SECRECIÓN EN *Streptomyces*: LA RUTA TAT

Aparte de la ruta Sec, se ha descrito la existencia de un proceso alternativo de secreción de proteínas a través de la membrana plasmática de procariotas, dependiente de péptido señal y que tiene como característica más relevante y diferencia principal

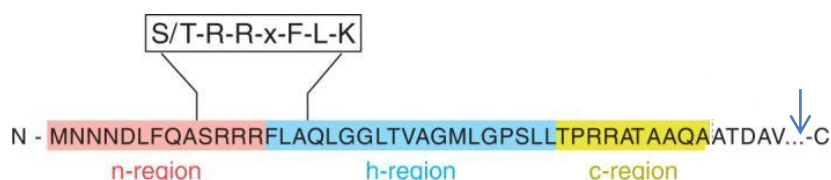
respecto a la ruta Sec su capacidad de translocar proteínas oligomerizadas (en algunos casos unidas a un cofactor) que han adquirido cierto grado de plegamiento. Esta vía utiliza únicamente la fuerza protón-motriz generada por el gradiente de pH transmembranal. Es la denominada ruta Tat (del inglés, Twin arginine translocation). Las proteínas conocidas translocadas por medio de este sistema son proteínas extracelulares y ciertas proteínas de membrana (Schaerlaekens y col., 2001). Las proteínas que van a ser secretadas adquieren sus cofactores en el citoplasma cuando han alcanzado una conformación plegada (Berks y col., 2000). En mutantes de *E. coli* deficientes en la ruta Tat se ha comprobado que proteínas precursoras que se acumulan en el citoplasma contienen cofactores (Sargent y col., 2001).

La vía Tat se encuentra ampliamente extendida en el mundo microbiano y en plantas, habiéndose encontrado homólogos de los genes que codifican el aparato de transporte en archaea, bacterias y cloroplastos y mitocondrias de las plantas (Santini y col., 1998).

#### **4.1.- Péptido señal Tat**

Las proteínas que van a ser transportadas vía Tat contienen un péptido señal arquetipo con un par de argininas conservado incluido en la secuencia consenso [S/T]R-R-x- $\phi$ - $\phi$ , en el límite entre el dominio H y la región N (Widdick y col., 2006; Bogsch y col., 1998; De Buck y col., 2008), donde  $\phi$  representa un aminoácido hidrofóbico, frecuentemente F-L-K. La región H es más larga y menos hidrofóbica que la de los péptidos señales de las proteínas que van a ser secretadas por la ruta Sec debido a la presencia de más residuos de glicina y treonina, y la región carboxilo terminal con frecuencia está provista de residuos básicos que aportan carga positiva en contraste con lo que ocurre en los péptidos señal de Sec, los cuales casi nunca se encuentran cargados en esta región (Tullman y col., 2007). En *E. coli* se han podido observar señales distintivas adicionales que contribuyen a la especificidad del péptido líder por la vía Tat como son la carga de los primeros aminoácidos de la proteína madura y la presencia de chaperonas específicas que secuestrarían al péptido señal del reconocimiento de la maquinaria Sec (Tullman y col., 2007). En general, los péptidos líderes tipo dependientes de Tat son más largos que sus homólogos Sec en *E. coli*, con unos 38aa (debido sobre todo a la extensa región amino), y 24aa de media respectivamente

(Cristóbal y col., 1999). Tal situación sin embargo, no se reproduce en el caso de *Streptomyces coelicolor*. En su caso, al analizar su genoma los resultados arrojaron una media de 42aa de péptido señal frente a los 39aa de los péptidos señal Tat predichos (Nielsen y col., 1997; Cristóbal y col., 1999).



**Figura 5. Ejemplo de péptido líder de las proteínas que van a ser translocadas por la ruta Tat.** Se encuadra la secuencia consenso con el característico par de argininas. Los dominios N, H y C, se indican en rosa, azul y amarillo, respectivamente. Se señala con una flecha el sitio de corte inmediatamente anterior a la cisteína. La secuencia se ha tomado de Lee y col, 2006.

El sistema Tat bacteriano más conocido es el de *E. coli*, que a su vez ha servido de guía para el estudio de la maquinaria Tat de otros organismos como *Bacillus*, *Streptomyces* y *Agrobacterium tumefaciens* (Ding Z., 2003). El funcionamiento de todos ellos es muy similar indicando que se trata de un sistema muy conservado a pesar de la baja homología de sus componentes en algunas especies (De Keersmaecker y col., 2005).

En líneas generales, la mayoría de las maquinarias de translocación Tat (translocasas o translocón) estudiadas, se componen de las proteínas TatA, TatB y TatC cuyos genes codificantes *tatA*, *tatB* y *tatC* se encuentran formando un operón. En *E. coli* existe un cuarto gen, *tatE*, separado de este operón, que codifica la proteína TatE y que es considerado como un duplicado de *tatA* (Bogsch y col., 1998), si bien únicamente se consigue un bloqueo total del exporte proteico en un doble mutante *ΔtatAE* (Schaerlaekens y col., 2001). En contraste con el sistema Tat encontrado en *E. coli*, algunos microorganismos poseen una translocasa tipo TatAC, es decir, carentes del componente TatB, sugiriendo que esta proteína no sería necesaria y que sus funciones son asumidas por TatA y TatC (Tarry y col., 2009). Dentro de este grupo se hallan archaea y la mayoría de las bacterias Gram positivas con bajo contenido G+C como por ejemplo, *Bacillus subtilis* (Pop y col., 2003), cuyo genoma contiene sin embargo dos copias del gen *tatC*. En el género *Streptomyces* se localizaron tres genes que codifican para TatA, TatB y TatC (Schaerlaekens y col., 2001). Este hallazgo diferenció estructuralmente el proceso Tat de *Streptomyces* de la generalidad de las



bacterias Gram positivas. Se ha determinado que los genes *tatA* y *tatC* en *S. lividans* están organizados en una estructura agrupada y *tatB* forma una unidad transcripcional independiente (Schaerlaekens y col., 2001).

#### **4.2.- Mecanismo general de secreción Tat**

Para la secreción de las proteínas por la ruta Tat, es necesaria la formación previa del complejo de translocación o translocasa, formada por el complejo protéico específico de membrana TatABC. En *E. coli* las proteínas TatA, TatB y TatC son exclusivas de membrana, siendo ésta la diferencia principal respecto a lo que ocurre en *S. lividans*, donde, con excepción de TatC, TatA y TatB se localizan en el citosol y en la membrana (De Keersmaecker y col., 2005).

Básicamente, y en base a la ruta Tat referida para *E. coli*, este proceso de secreción consta de tres fases bien determinadas:

Inicialmente se produce el reconocimiento del oligómero precursor de forma similar a lo que ocurre en la ruta Sec, por medio de su péptido señal, que constituye el aviso para el complejo TatCB que actuará como receptor (Alami y col., 2003; Alami y col., 2002; Cline y col., 2001; De Leeuw y col. 2002; De Keersmaecker y col., 2005). De forma más definida, TatC está provista de una región que le permite reconocer el motivo de doble arginina del péptido líder de la proteína precursora (Buchanan y col., 2002). Aunque el anclaje inicial al oligómero que se va a secretar será efectuado por TatC, TatB participa entrando en contacto con el péptido señal y con parte de la proteína madura del precursor.

En segundo lugar, la fuerza protón motriz dirige la formación de una translocasa activa mediante el desplazamiento del complejo TatCB-precursor a lo largo de la membrana hasta ensamblarse con TatA. Es entonces cuando el sustrato es transportado a través del poro constituido por varias subunidades de TatA (Alami y col., 2003; Gohlke y col., 2005; Mori y col., 2002).

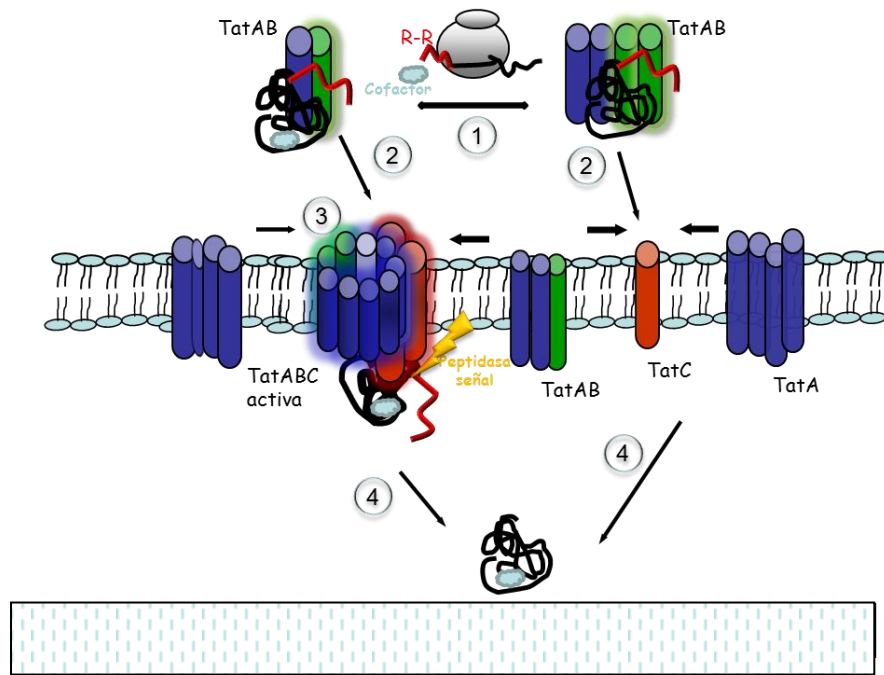
Para finalizar, el proceso acaba con la etapa de escisión del péptido líder bajo la acción de las peptidasas señales.

Existe un acoplamiento entre la traducción y la secreción (Olivier, D., 1985; Gennity y col., 1990) y se ha descrito que la mutación en el gen *tatC* provoca la

abolición total del transporte así como la existencia de efectos pleiotrópicos en *E. coli* (Eijlander y col., 2009).

En *S. lividans* los componentes TatA y TatB solubles se encuentran como hetero u homo-oligómeros y presentan afinidad para unirse a los precursores, siendo mayor la de TatB. Estas dos proteínas, TatA y TatB, están muy relacionadas por su secuencia. A TatC, que se mantiene embebida en la membrana plasmática, se le atribuye un papel clave en el ensamblaje del complejo translocasa con la unión específica e inserción del complejo TatAB-proteína precursora a la membrana. TatC es el componente de la ruta Tat más conservado lo que proporciona una idea de cuán esencial es para el proceso de la translocación (Bogsch y col., 1998). La deficiencia en *tatC* también tiene efectos pleiotrópicos en *S. coelicolor* (Widdick y col., 2006).

Otra característica distintiva del sistema Tat de *Streptomyces* fue el hallazgo de que TatA y TatB citosólicas se unían preferentemente a los péptidos señales Tat antes de su interacción con la translocasa (complejo TatABC membranar), lo que apunta que TatC no es el sitio de reconocimiento primario para las preproteínas dependientes de Tat como lo es en *E. coli* (De Keersmaecker y col., 2007) y alimenta la idea de que ambas proteínas están involucradas en el traslado de la proteína precursora a la translocasa. Tras el reconocimiento de la proteína de nueva síntesis por el complejo TatAB citosólico y su posterior interacción con TatC en la membrana, se producirá una reorganización de los componentes en la membrana y varias subunidades de TatA membranar van a asociarse para formar el poro de translocación propiamente dicho, supuestamente adoptando la forma necesaria para cada proteína que se va a translocar (Tarry y col., 2009). La habilidad para unirse a preproteínas dependientes de Tat así como su localización citosólica sugiere que tanto TatA como TatB, independientes o asociadas, están involucradas en el reclutamiento de pre-proteínas Tat-dependientes hacia la translocasa (De Keersmaecker y col., 2005). El sitio de reconocimiento inicial para la unión del complejo TatAB está probablemente situado en el motivo de doble arginina del péptido líder aunque un pequeño porcentaje llega a interaccionar con la parte madura (De Keersmaecker y col., 2007).



**Figura 6: La maquinaria Tat en *S. lividans*.** El complejo TatAB soluble reconoce la doble arginina (R-R) de la proteína precursora (1) transportándola directamente hacia la membrana donde se halla TatC que reconocerá el complejo TatAB-precursor (2). Tras una reorganización de los componentes en la membrana, se reclutan de nuevo complejos adicionales TatA o TatAB para formar un sistema de translocación funcional que contiene TatABC (3). Por último la asociación se disgrega una vez el sustrato se transloca (De Keersmaecker y col., 2005) (4).

Se considera que la ruta Tat es un sistema modular, altamente dinámico, en el que las proteínas integrantes existen como unidades separadas u oligomerizadas en ausencia de precursor y que, tras haberlo detectado, se unen a él para posteriormente asociarse y formar el poro completo de la translocasa activa, TatABC (Mori y col., 2002; Alami y col., 2003).

## OBJETIVOS

## OBJETIVOS

El trabajo se ha enfocado principalmente en dos objetivos diferenciados:

1. Caracterización de la mutación del gen *lsp* y su efecto sobre la secreción de proteínas extracelulares en *S. lividans*.
2. Determinar el grado de la posible versatilidad de los péptidos líderes de proteínas modelo para dirigir la secreción de las mismas por las rutas Sec y/o Tat en *S. lividans*.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. MATERIALES

#### 1.1.- Cepas bacterianas

Las estirpes utilizadas en este trabajo, junto con su genotipo, de *E. coli* y *S. lividans* se relacionan en las Tablas 1 y 2 respectivamente.

##### *E. coli*

**Tabla 1. Ceba bacteriana de *E. coli* utilizada**

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E.coli DH5<math>\alpha</math></i>	Sup E44, thi-, $\Delta$ (lacZYA-arg F) U169, F- $\phi$ 80d lacZ $\Delta$ M15	Hanahan, 1983

##### *Streptomyces*

**Tabla 2. Cepas bacterianas de *Streptomyces* utilizadas**

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>S. coelicolor A3(2)</i>	SCP1-, SCP2-	Hopwood y col. (1985)
<i>S. lividans</i> 66 TK21	SLP2-, SLP3-	Keiser y col. (2000)
<i>S. lividans</i> 66 TK21 $\Delta$ <i>lsp</i>	SLP2-, SLP3-, <i>lsp</i> -	Este trabajo
<i>S. lividans</i> 66 TK21 $\Delta$ <i>tatC</i>	SLP2-, SLP3-, <i>tatC</i> -	Este trabajo
<i>S. lividans</i> 66 TK21 $\Delta$ <i>secG</i>	SLP2-, SLP3-, <i>secG</i> -	Palomino y col.(2008)

#### 1.2.- Plásmidos

En la Tabla 3 se presentan los plásmidos con origen de replicación en *Escherichia coli* con sus características más relevantes y en la Tabla 4 los plásmidos con origen de replicación en *Streptomyces*.

Tabla 3. Plásmidos con origen de replicación en *Escherichia coli*

Plásmido	Características	Resistencia	Referencia
pUC19	Selección por actividad $\beta$ -galactosidasa	Ampicilina	Norrande y col., 1993
pUZ8002	Plásmido derivado de RK2 con el <i>oriT</i> ( <i>aph</i> ) defectivo; permite la movilización en <i>trans</i> del plásmido que contiene el <i>oriT</i> .	Kanamicina	Keiser y col., 2000
pIJ790	Plásmido derivado de pKD20, contiene el sistema $\lambda$ RED de recombinación (Datsenko y Wanner, 2000).	Cloramfenicol	Gust y col., 2002.
pIJ773	pBluescript SKII que contiene el gen para la resistencia a apramicina y el <i>oriT</i> flanqueado por secuencias FRT.	Apramicina	Gust y col., 2002.

Tabla 4. Plásmidos con origen de replicación en *Streptomyces*

Plásmido	Características	Resistencia	Referencia
pIJ486	Plásmido multicopia sonda de promotores con gen testigo <i>neo</i> .	Tioestreptona	Ward y col., 1986
pIJ487	pIJ486 con el sitio de clonaje múltiple en orientación contraria.	Tioestreptona	Ward y col., 1986
pAGAs1	pIJ486 con un inserto de 5kb que contiene el gen <i>dagA</i> de <i>S.coelicolor</i> A3(2) en el sitio <i>Bam</i> HI	Tioestreptona	Parro y Mellado, 1993
pAGAS5	pIJ486 que contiene un fragmento de 5Kb que incluye el gen <i>dagA</i> con su propio promotor.	Kanamicina. La fase de lectura del gen de resistencia al tioestreptona está modificada.	Palacín, 2002
pAGA500	pIJ487 con un fragmento que contiene la región que codifica los últimos seis aminoácidos del péptido señal y la parte madura de la agarasa, e incluye el terminador de transcripción del <i>dagA</i>	Tioestreptona	Parro, 1993



pAGAs20	pIJ487 conteniendo la región promotora del gen <i>dagA</i> y la secuencia que codifica el péptido líder y los 7 primeros aa de la agarasa madura para mantener el entorno del sitio de procesamiento para la peptidasa señal.	Tioestreptona	Parro y Mellado, 1994
pAGA502	pAGA500 con el inserto que contiene la región promotora del gen <i>dagA</i> fusionada con la región codificante del péptido señal de la $\alpha$ -amilasa y de los 3 primeros aa de la $\alpha$ -amilasa madura.	Tioestreptona	Isiegas, 1999
pAMI11	pIJ486 que contiene un fragmento de 3Kb que incluye el gen <i>aml</i> con su propio promotor.	Kanamicina. La fase de lectura del gen de resistencia a tioestreptona está modificada	Palacín, 2002
pAMI2003	pAGAs20 con un inserto que contiene la parte madura de la $\alpha$ -amilasa.	Tioestreptona	Isiegas, 1999
pFD666	Vector lanzadera para E.coli y actinomicetos.	Kanamicina	Denis y Brzezinski, 1992
pFDxlnC	pFD666 conteniendo el fragmento de 1Kb que incluye el gen <i>xlnC</i> con el promotor del inhibidor de subtilisina.	Kanamicina	Denis y Brzezinski, 1992

### 1.3.- Reactivos

#### 1.3.1. Productos químicos

Los productos utilizados se adquirieron de las siguientes firmas comerciales: Aldrich; Biorad; Boehringer Mannheim, Fermentas, Merck; New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Roche y Sigma.

### **1.3.2. Enzimas**

Las enzimas empleadas en la manipulación de ácidos nucleicos, incluyendo las endonucleasas de restricción, la fosfatasa alcalina, la Taq polimerasa, la High Fidelity polimerasa, enzimas empleadas en la qRT-PCR tiempo real, se obtuvieron de las firmas Amersham, Boehringer Mannheim, Ecogen S.R.L., Fermentas, Pharmacia, Ambion, Applied Biosystem y Roche.

### **1.4.- Medios de cultivo**

#### *Escherichia coli*

**Medio LB:** Bactotripton 1%, extracto de levadura 0,5%, ClNa 1% (Maniatis y col., 1982). Para la preparación de LB sólido se añadió agar bacteriológico europeo (Pronadisa) a una concentración de 2%.

#### *Streptomyces*

**Medio Mínimo sólido:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5%;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0,05%;  $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,02%;  $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%, agar a una concentración de 2%. A pH 7,2. Tras esterilizar se añadió la fuente de carbono estéril (Keiser y col. 2000).

**R5 sólido:** Sacarosa 10,3 %;  $\text{SO}_4\text{K}_2$  0,025%;  $\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,012%; glucosa 1%; casaminoácidos (DIFCO) 0,01%; extracto de levadura 0,5%; tampón TES 0,573%; elementos traza 0,2%. Se ajustó el pH a 7,3, se añadió agar bacteriológico (OXOID) hasta 2,2% y se esterilizó. Posteriormente se suplementó con  $\text{POH}_2\text{K}$  0,005%;  $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  20 mM; L-prolina 0,3% y NaOH 7 mM (Thompson y col., 1980).

**MS:** Manitol 2%, harina de soja 2% y agar bacteriológico 2% (OXOID) (Keiser y col., 2000).

**DNA:** Difco Nutrient Agar 2,3% (Keiser y col., 2000).

**SNA:** Difco Nutrient Broth 0,8% y agar (OXOID) 0,6% (Keiser y col., 2000).

**Solución de pregerminación:** Yeast extract (DIFCO) 1%, casaminoácidos (DIFCO) 1%.

**Medio Mínimo líquido (NMMP):**  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  0,2%; casaminoácidos (DIFCO) 0,5%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,06 %;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0001%;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0001%;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,0001%;  $\text{CaCl}_2$  0,0001%. El medio se esterilizó y en el momento de usar se añadió tampón fosfato ( $\text{H}_2\text{NaPO}_4/\text{HK}_2\text{PO}_4$  0,1M pH 6,8) hasta una concentración final de 0,015 M, la fuente de carbono y el inóculo de esporas pregerminadas (Keiser y col., 2000).

**YEME (Yeast Extract Maltose Extract):** Extracto de levadura 0,3%; extracto de malta 0,3%; bactopectona 0,5%; glucosa 1% y sacarosa 10,3%. Se esterilizó y se completó con  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  hasta 5mM. Para la preparación de protoplastos se añadió, además, glicocola hasta 0,5% (Keiser y col., 2000).

**Solución de elementos traza:**  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  4% ;  $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20% ;  $\text{ClCu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1% ;  $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1% ;  $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  1% ;  $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4) \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1% .

**Tampón para protoplastos:** Solución base 4 ml, 50  $\mu\text{l}$   $\text{PO}_4\text{KH}_2$  0,5% (v/v); 500  $\mu\text{l}$   $\text{Cl}_2\text{Ca}$  3,68% (v/v) y 500  $\mu\text{l}$  TES pH7; 250 mM 5,735 (v/v), (Keiser y col., 2000).

**Solución base:** Sacarosa 10,3 g,  $\text{SO}_4\text{K}_2$  0,025 g,  $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,202 g y elementos traza 0,2 ml (Keiser y col., 2000).

## **1.5.- Juegos comerciales para la extracción y purificación de ADN**

Se han utilizado diferentes kits comerciales en los siguientes métodos: extracción de ADN cromosómico (Sigma); extracción de ARN (Qiagen), purificación de ADN de bandas de agarosa (Amersham/Qiagen); extracción y purificación de ADN plasmídico (QIAGEN).

## **2. MÉTODOS**

### **2.1.- Condiciones de cultivo y conservación de cepas**

Las cepas de *E. coli* se cultivaron rutinariamente a 37°C con agitación a 250 rpm. Cuando fue necesario el medio se suplementó con ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$  o kanamicina 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Las diferentes cepas de *E. coli* se conservaron como suspensiones de células en glicerol al 50% a  $-20^{\circ}\text{C}$ , a partir de cultivos procedentes de colonia aislada y crecidos en LB con los antibióticos necesarios.

Las cepas de *S. lividans* se cultivaron en medio YEME a  $30^{\circ}\text{C}$  con agitación a 250 rpm, durante 48 o 60 horas según cepa para obtención de biomasa y preinóculos.

Para contrastar crecimiento de las cepas de *S. lividans* mutantes y las que contenían plásmidos en multicopia con el de las correspondientes cepas isogénicas se realizaron curvas de crecimiento en medio definido líquido. En estos experimentos los cultivos se pusieron en marcha en medio NMMP de forma sincronizada mediante la inoculación de 0,1mg/ml de peso húmedo a partir de preinóculos de micelio en el caso de los mutantes (debido a su peor crecimiento y formación de esporas) o pregerminación de esporas en el caso de las cepas con plásmidos multicopia. El proceso de pregerminación consistió en un breve choque térmico para activar las esporas (10 min. a  $50^{\circ}\text{C}$ ), seguido de una incubación en medio rico (“solución de pregerminación”) hasta que se observó al microscopio que al menos un 50% de las esporas presentaba tubos de germinación. Se inocularon en medio mínimo NMMP suplementado con manitol 1% líquido a una densidad óptica a 450 nm entre 0.03 y 0.05. (Kieser y col., 2000). Los cultivos se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  y agitación a 250rpm. El crecimiento de los cultivos se siguió por determinación de la biomasa celular, expresándose en mg/ml de peso seco, que se realizó tomando muestras triplicadas de 1 ml de cultivo, tras ser centrifugadas se secaron a vacío en una Sanvant Speedvac CS10 hasta conseguir un peso constante. La selección de cepas se realizó en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  tioestreptona, kanamicina o apramicina en medio sólido y de 10  $\mu\text{g/ml}$  (YEME) ó 5  $\mu\text{g/ml}$  (NMMP) para estos mismos antibióticos en medio líquido.

Cuando fue posible las cepas se conservaron en forma de esporas, que se recogieron a partir de placas de MS. Los mutantes *S.lividans* TK21  $\Delta lsp$ ,  $\Delta tatC$  y  $\Delta secG$  así como las cepas quimera de  $\Delta tatC$  se conservaron en forma de micelio en glicerol al 50% (v/v) a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Keiser y col., 2000).

## 2.2.- Purificación de ácidos nucleicos

### 2.2.1. Obtención de ADN

Las técnicas generales que se siguieron para la extracción de ADN plasmídico y cromosómico de *Streptomyces* proceden de los métodos descritos en Keiser y col. (2000). La preparación y manipulación de ADN de *E. coli* se hizo según Sambrook y col. (1989). Cuando fue necesario se utilizaron los kits indicados en el apartado 1.5 para la preparación de ADN.

La pureza y concentración del ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies) y por análisis electroforético en geles de agarosa entre el 0,8% y 1% según el caso.

Las digestiones de plásmidos y fragmentos con endonucleasas de restricción y las ligaciones de los mismos se llevaron a cabo según las condiciones e instrucciones recomendadas por el distribuidor de las enzimas y Sambrook y col. (1989).

Las electroforesis y purificaciones de ADN se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos descritos por Sambrook y col. (1989), Kieser y col. (2000) y Görg y col. (2000).

La secuenciación fue realizada por SECUGEN (Servicio de secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas), utilizando un secuenciador automático de ADN, AVI-PRISM©3700 de (Applied Biosystems).

### 2.2.2. Preparación de ARN: condiciones de cultivo y purificación

La cepa TK21 y las cepas mutantes en *lsp* y *tatC*, se cultivaron a 30°C y 250 rpm en medio mínimo NMMP sin antibiótico para evitar su posible interferencia en la expresión génica de la bacteria y se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 2.1.

Para la extracción de ARN se adaptó el kit “RNeasy Midi” de Qiagen añadiendo los procesos para la disrupción y homogeneizado de lisado celular correspondientes al método de purificación de Kirby y col., (1967) modificado según Keiser y col., (2000).

El micelio proveniente de entre 50 y 80 ml de cultivo dependiendo de la cepa y su tiempo de recogida se sometió a un proceso de fuerte agitación en presencia de 5 ml de tampón de lisis (SDS 1% (p/v) , EDTA 160mM, pH 8), bolas de cristal de 1 mm de

diámetro, y 1 ml fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1). A continuación se añadieron 4 ml de tampón RTL (Rneasy Midi de Qiagen) y 40 µl de β-mercaptoetanol con una nueva agitación vigorosa. Las proteínas de la muestra se extrajeron con 8 ml de fenol/cloroformo/isoamílico. Previo a todo este proceso, el material de vidrio empleado así como las puntas de pipeta utilizadas fueron sometidos a dos tandas de esterilización para eliminar cualquier vestigio de ARNasas y de esta manera minimizar el riesgo de contaminación del ARN.

A continuación se siguió con el protocolo según las indicaciones especificadas por el fabricante.

La concentración del ARN también se verificó por absorbancia a 260 nm y a 280 nm en espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies). Su pureza y calidad fueron comprobadas en la unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología por medio de Bioanalyzer (Agilent Technologies).

### **2.3.- Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Los oligonucleótidos empleados como cebadores (Tabla 6) para la PCR fueron suministrados por Sigma Aldrich Genosys.

La amplificación de fragmentos de ADN se realizó mediante PCR en un termociclador automático (PTC-100<sup>TM</sup> Research, Inc.). Los ADN empleados como molde para la amplificación por PCR pertenecen a *S. lividans* TK21. Las muestras se prepararon por triplicado en un volumen final de reacción de 100 µl. Las reacciones de PCR contenían ADN molde (500 ng) de *S. lividans* TK21, 0,1 mM de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Amersham), 40 pmoles de cada oligonucleótido cebador (Sigma Genosys), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampón 1X de EcoTaq (Ecogen S.R.L.), 5% de DMSO y 1U de EcoTaq ADN polimerasa (Ecogen S.R.L.). La amplificación se realizó mediante un ciclo de desnaturalización de 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C a 65°C (dependiendo de los oligonucleótidos) y 2 min a 72°C y ciclo final de elongación de 10 min a 72°C.

Las amplificaciones de fragmentos de ADN destinadas a generar los mutantes en *lsp* y *tatC*, se realizaron con la polimerasa High Fidelity de Roche, según el protocolo descrito en el manual del sistema Redirect (Gust y col., 2002).

Se llevaron a cabo amplificaciones de comprobación de ADN de colonia de *Streptomyces* en un volumen final de 50 µl. Para estas reacciones se empleó la EcoTaq ADN polimerasa (Ecogen S.R.L.) con las mismas condiciones descritas arriba, a excepción del ADN molde, que se obtuvo a partir de una solución de ADN tras trasvasar la colonia en 20 µl de DMSO 100%.

Los oligonucleótidos empleados para el trabajo experimental se indican en las tablas siguientes.

**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la técnica Redirect**

<i>Oligo</i>	<i>Secuencia</i>
RD-Lsp-FR	TCAAGGACCTAGGCTGAGGGACTCACGTGGCTAGCATTCCGGGGATCCGT CGACC
RD-Lsp-RE	GACAACCAGTCCCTGTGGACAGCCGGACCGGAGGGGTCAGCTAGCTGTAG GCTGGAGCTGCTTC
Lsp.FR	AGGACGACAACCTGATCTGTAGTACGGCG
Lsp.RE	CAGCACGGCCCCGATTCAGCAGCTCCTCG
TatC.e.FR	CCATGTAGGCCCTCTGAAAA
TatC.e.RE	GGTACGGTCATCCGTCGTAA
TatC.Apr.FR2	GGGCGGCGACGCGTGCCGTCACCGCCCCGGCGGTCCTCATGTAGGCTGGA GCTGCTTC
TatC.Apr.RE2	TGATCTCCGGCCCCGCCGACGAGATGGGAACGTGGGTTGATTCCGGGGAT CCGTCGACC
TatC.FR	CTCAAGAGCGAGGCCAAG
TatC.RE	TCTGTCATCGTGCTTTCGAG

**Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para amplificación de *fkpA* y *lsp***

<i>Oligo</i>	<i>Secuencia</i>
FKBP.P	TTTTGGATCCTTCTCACGCCGTAGAGTTGC
FKBP.T	TTTTGGATCCCCCTCCCAGATGTCCTTGAT
LSP.P	TCAAGGATCCCTACGGGAGAAGCCGAACAT
LSP.T	TACAGGATCCCACAGGCAGCAAGAACATCA

## 2.4.- PCR cuantitativa en tiempo real.

Tras extraer el ARN y una vez purificado, se sometió al tratamiento con ADNasa libre de ARNasa previo a su uso en qRT-PCR en tiempo real, para lo que se utilizó el kit “Turbo DNA-Free” (Ambion) según las indicaciones del fabricante. La transcripción reversa de 10 µg de ARN total en un volumen final de 100 µl, se realizó

con “High Capacity Archive kit” de Applied Biosystem, usando hexámeros al azar como cebadores según indica el fabricante.

La subsiguiente PCR en tiempo real, se llevó a cabo utilizando “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) y se analizó el resultado en “ABI Prism 700 Sequence Detection System” (Applied Biosystems). Como molde se usaron 5 µl de ADNc marcado, que se desnaturalizaron mediante una incubación de 10 minutos a 95°C. Se realizaron 40 ciclos de amplificación y cuantificación (15 segundos de desnaturalización a 95°C y 1 minuto a 60°C) y un ciclo de 10 minutos de extensión final a 72°C. Las amplificaciones se realizaron por triplicado. Como marcador interno de amplificación se utilizó el gen *hrdB* (Pang y col., 2004), que codifica para el factor sigma mayoritario en *S. lividans* y cuya expresión permanece constante a lo largo de todas las etapas de crecimiento. El tratamiento de datos se llevó a cabo mediante las indicaciones dadas en “7300 Real-Time PCR system” de Applied Biosystems para un proceso de cuantificación relativa por comparación de valores Ct (número de ciclo al cual la curva de amplificación, en su periodo de comportamiento exponencial, cruza el umbral de fluorescencia basal). El resultado final obtenido por medio de este tipo de cuantificación se expresa, de la misma manera que en el caso de micromatrices, mediante un valor de umbral de expresión (Fold Change) de la cepa problema respecto a cepa control.

Los oligonucleótidos utilizados en la PCR a tiempo real se ennumeran en la siguiente tabla.

**Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en el estudio de qRT-PCR.**

<i>Oligo directo (D)</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Oligo reverso (R)</i>	<i>Secuencia</i>
HrdB.D	CGCGGCATGCTCTTCCT	HrdB.R	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC
SLI0297.D	CGGGCTACTACGGCTTCTAC	SLI0297.R	CTTCCTCAAGGGTGGTGAA
SLI1513.D	GCGAGAAGCAGGAGAAGAAG	SLI1513.R	CTCCAGCTCCCACTTGATG
SLI1632.D	CGAAGGTGCTCATCGAGTT	SLI1632.R	AAGGAGAGACCGAAGACGAC
SLI1860.D	ACCGTCCTCGGCAAGAAG	SLI1860.R	GGTTGACGGAGACCTTGAGT
SLI2001.D	GCAACAGCAGCTACGACAAC	SLI2001.R	CTGTTGCGGCACAGGTAGT
SLI2074.D	CGAGCCGATCGAGATCAT	SLI2074.R	GGCGATCACCGTGAAGAT
SLI2116.D	AACGAGTCGCTGACGAAGTA	SLI2116.R	TTGAAGCGGATCGGGTAGT
SLI6197.D	AGAAGGGTATCCGGCCTCAA	SLI6197.R	ACCGACTCGTAGGACCAGAC



## **2.5.- Hibridación y procesamiento de micromatrices**

Las micromatrices que contenían el genoma de *S.coelicolor* contra el que se hibridaron las muestras, fueron proporcionados por Eurogentec, (Bélgica) y fueron procesados por el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología.

Los datos de intensidades se trataron estadísticamente mediante el programa FIESTA (Smyth; 2004) usando al menos los datos pertenecientes a tres replicas biológicas. Se tomó como umbral de expresión diferencial un valor de al menos  $\pm 2,5$  en la relación de intensidad de hibridación entre el control (tipo salvaje) y la muestra problema (mutante).

## **2.6.- Transformación génica**

### ***E. coli***

La preparación de células competentes DH5 $\alpha$  se realizó según el protocolo descrito por Inue y col., (1990). La transformación se realizó según el protocolo descrito por Zaballos y col., (1987).

### ***Streptomyces***

La transformación de cepas de *Streptomyces* se realizó siguiendo el método descrito por Keiser y col. (2000). En las transformaciones se utilizaron alícuotas de protoplastos en suspensión almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La obtención de protoplastos de las cepas de *Streptomyces* se llevó a cabo según el protocolo especificado por Hopwood y col. (1985). Las alícuotas de protoplastos se descongelaron rápidamente en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  y se lavaron una vez con 1 volumen de tampón de protoplastos para eliminar trazas de endonucleasas. Para mejorar la eficiencia de transformación del ADN, éste se desnaturalizó con NaOH 1M (Bibb y col., 1978).

## **2.7.- Construcción de cepas sobreproductoras y mutantes**

Para el clonaje y propagación de plásmidos se utilizaron *E.coli* DH5 $\alpha$  de acuerdo al protocolo descrito por Hanahan y col. (1983), cultivándose en medio Luria broth (LB).

### 2.7.1. Clonaje *lsp* en pIJ487

Para la obtención de la cepa sobreproductora de *lsp*, en primer lugar se realizó una amplificación por PCR a partir del genoma de *S. lividans* TK21, de un fragmento de 1128 pb que contenía el gen *lsp* utilizando los oligonucleótidos LSP.P y LSP.T. El fragmento amplificado se subclonó vía *Bam*HI en el vector con resistencia a ampicilina pUC19, interrumpiendo el gen *lacZ* que proporciona color azul a las colonias en presencia de X-gal. Aquéllas que hubieran incorporado el plásmido con el inserto serían de color blanco. Una vez se obtuvieron las colonias deseadas, el siguiente paso fue trasplantarlas al plásmido sonda de promotores pIJ487, que lleva el gen de resistencia a kanamicina como gen de referencia, así como el gen de resistencia a tioestreptona, de nuevo con dianas de restricción *Bam*HI en los extremos del inserto y previa digestión del vector con la misma enzima y tratamiento con fosfatasa alcalina. Posteriormente se transformaron protoplastos de *S. lividans* TK21.

Las colonias resistentes a tioestreptona se analizaron por PCR de colonia o minipreps y los clones positivos se verificaron por secuenciación.

Los clones resultantes se denominaron TK21[pIJ*lsp*]. La cepa multicopia *S. lividans* TK21[pIJ487] se obtuvo mediante la transformación de protoplastos de *S. lividans* con el plásmido de alto número de copias pIJ487.

### 2.7.2. Obtención de cepas sobreproductoras de $\alpha$ -amilasa y agarasa

Se transformaron protoplastos de *S. lividans* TK21 con los plásmidos pAMI11, pAGAs5, pAMI2003 y pAGA502 procedentes de la colección del laboratorio, generándose las cepas sobreproductoras TK21[pAGAs5] y TK21[pAMI11], TK21[pAMI2003], TK21[pAGA502]. Se efectuó la misma transformación con el vector pFD*lnC* proporcionado por el laboratorio del Dr. Jozeff Anné, Rega Instituto K.U. Lovaina, Bélgica, dando como resultado la cepa TK21[pFD*lnC*].

### 2.7.3. Clonaje de *fkpA* en pAGAs5

Se dirigió vía *Xba*I-*Hind*III la inserción del fragmento de 1223pb que contenía el gen *fkpA* previamente amplificado por PCR con los oligos FKBP.P y FKBP.T (tabla 6) en el plásmido pAGAs5 delante del gen *dagA* y se generó el plásmido [pAGA*fkpA*], que lleva ambos genes bajo el control de sus respectivos promotores. Se transformaron

protoplastos de TK21 con esta construcción y se obtuvo la cepa TK21[pAGA/*kpA*], resistente a kanamicina.

#### 2.7.4. Obtención de mutantes

Los mutantes en *lsp* y *tatC* se construyeron de acuerdo con el protocolo Redirect desarrollado en el John Innes Centre de Norwich, Reino Unido (Gust y col; 2002).

Brevemente, para la obtención del mutante en *lsp* se empleó el cósmido SCO939111 de *Streptomyces coelicolor* que contiene la secuencia codificante del gen *lsp*, y se utilizó para sustituir dicho gen por el cassette de resistencia a apramicina. Para el mutante en *tatC*, este primer paso fue ligeramente modificado y se construyó un pseudocósmido para la obtención de un plásmido recombinante mediante la amplificación de 8 kb del cromosoma de *S.lividans* con los oligonucleótidos TatC.e.FR y TatC.e.RE. La zona de amplificación incluye el gen *tatC* en posición central.

A partir de este punto, el procedimiento es el mismo en ambos mutantes. El cassette de apramicina se obtuvo mediante PCR amplificando a partir del molde pIJ773 con los oligonucleótidos RD-Lsp-FR y RD-Lsp-RE para el mutante en *lsp* y TatC.Apr-FR2 y TatC.Apr.RE2 para el mutante en *tatC* (Tabla 5), que contienen en los extremos 5' colas de 39 nt homólogas a las secuencias anterior y posterior de la región codificante del gen en cuestión. El producto de PCR se electroporó en la cepa de *E.coli* que porta el cósmido y el sistema de recombinación de  $\lambda$ -red (Datsenko & Wanner, 2000). Los clones resistentes a apramicina fueron analizados por PCR de colonia para confirmar la presencia de cósmido recombinante utilizando los oligonucleótidos Lsp.FR y Lsp.RE en el caso de  $\Delta$ *lsp* y TatC.FR y TatC.RE en el caso de  $\Delta$ *tatC*. Los mutantes se obtuvieron por recombinación homóloga del cósmido recombinante tras la conjugación de *E.coli* pUZ8002 y *S. lividans* TK21. Los clones resultantes se comprobaron mediante PCR de colonia y PCR de ADN cromosómico.

#### 2.7.5. Transformación de mutantes con construcciones híbridas

Protoplastos del mutante *S. lividans tatC* y *secG* fueron transformados con los plásmidos pAMI2003, pAGA502 y pFDxlnC, dando lugar a las cepas  $\Delta$ *tatC*[pAMI2003],  $\Delta$ *tatC*[pAGA502],  $\Delta$ *tatC*[pFDxlnC] y  $\Delta$ *secG*[pAMI2003],  $\Delta$ *tatC*[pAGA502] y  $\Delta$ *secG*[pFDxlnC].

## **2.8.- Ensayos de proteínas**

A partir de los sobrenadantes obtenidos en las curvas de crecimiento se precipitaron las proteínas con sulfato amónico al 80% de saturación (ensayos de actividad de proteínas), o con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 10% y ácido deoxicólico (DOC, 0,02%) para geles y Western blot. En ambos casos de precipitación, las muestras se incubaron durante la noche a 4°C. A continuación se centrifugaron en una centrífuga Sorval a 10000 rpm durante 30 minutos (Dowson y col. 1969). Las proteínas precipitadas con sulfato amónico fueron resuspendidas en Tris HCl 10mM pH 7.5 en proporción 1/50 según el volumen precipitado.

### **2.8.1. Determinación de la concentración de proteínas**

La determinación de proteínas se cuantificó mediante el método Bradford a partir de extractos de proteínas con el kit comercial Bio-Rad Protein Assay (BioRad), usando como proteína patrón la gamma-globulina bovina estándar I (BioRad). En otros casos se empleó el método BCA, BioRad protein determination kit de Pierce según las instrucciones del fabricante.

### **2.8.2. Ensayo de actividad inhibidor de subtilisina**

Diferentes alícuotas se llevaron a un volumen final de 250 µl en Tris-HCl 0.1M pH 8.6 y en presencia de  $2,85 \times 10^{-4}$  U de subtilisina (Sigma Chemical Co.), después de 10 minutos de incubación a 25°C se añadió 0,25mM de sustrato N-succinil-L-ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilida (Sigma Chemical Co.), se incubó a 25°C hasta que el control positivo viró a amarillo, como se describe en Kojima y col., 1990. En ese momento se midió la absorbancia a 450nm. La presencia del inhibidor de la subtilisina se refirió como porcentaje de actividad subtilisina residual después del período de incubación.

### **2.8.3. Actividad agarasa en medio líquido**

En un volumen final de 1 ml se llevó a cabo una detección de azúcares reductores según Dygert y col. (1965). A una mezcla de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa) al 0,1% e imidazol-HCl 50mM de concentración final y pH 6.5, se adicionó la muestra de proteínas precipitadas con sulfato amónico y resuspendidas en Tris-HCl 10mM, hasta un volumen de 1ml. Después de 15 minutos de incubación a 37°C, se

añadió una solución de sulfato de cobre ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4% p/v, glicina 1,6% p/v y  $\text{CuSO}_4$  0,045% p/v). Una vez mezclado, se incubó en agua hirviendo durante 10 minutos y se enfrió bajo agua del grifo. Se diluyó hasta 10ml con agua destilada y se midió la absorbancia a 450nm. Se tomó el 100% de la actividad agarasa al valor mayor de densidad óptica presentada por la cepa silvestre.

#### **2.8.4. Ensayo de agarasa en placa**

Para la realización de este experimento se utilizaron la cepa silvestre TK21 y los mutantes en *tatC* y *secG* transformados con los plásmido de alto número de copias pAGAs5 y pIJ487 que actúa como control del pAGAs5.

La siembra se efectuó a partir de micelio obtenido de cultivos a razón de 0,1mg/ml de peso húmedo. Se emplearon placas provistas de NMMP con agarosa al 1% sin antibiótico. Las placas se incubaron a 30°C durante 72 horas antes de ser teñidas con solución de Lugol (Sigma)  $\text{I}_2$  0,05M y KI 0,12M durante 45 minutos. La aparición de halos determinó la presencia de la agarasa (David y col. 2006; di Berardo 2008).

#### **2.8.5. Actividad $\alpha$ -amilasa**

El ensayo de detección de actividad  $\alpha$ -amilasa se basó en los protocolos descritos por Smith y Roe., (1949); Dygert y col., (1965); y Bernfeld, (1955).

En un volumen final de reacción de 300 $\mu$ l se incubó una mezcla de almidón al 1,5%, y 50 $\mu$ l de muestra resuspendidas en tampón fosfato 20mM pH 7, durante 30 minutos a 37°C en baño. Como proteína patrón y control positivo se empleó  $\alpha$ -amilasa comercial de *Bacillus amyloliquefaciens*, suministrada por Sigma-Aldrich. Pasado este tiempo se paró la reacción añadiendo 300 $\mu$ l de una solución de ácido dinitrosalicílico (DNS) compuesta por DNS al 1%, NaOH 0,4N y tartrato sódico al 30% y se hirvió 5minutos a 100°C en baño. Finalmente se midió la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3100pro, Amersahm Biosciences, atribuyéndose el 100% de la actividad  $\alpha$ -amilasa al valor de densidad óptica presentada por el control positivo.

#### **2.8.6. Electroforesis bidimensional**

A partir de las proteínas de los sobrenadantes precipitadas con TCA (30 $\mu$ g de proteína) se llevó a cabo una electroforesis bidimensional según el protocolo descrito

por Görg y col. (2000) y Rabilloud, (1998). Se llevó a cabo en el servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología.

## **2.9.- Electroforesis de proteínas y ensayos de Western-blot**

Tras añadir el TCA a los sobrenadantes de las curvas correspondientes, las alícuotas de sobrenadante se dejaron en hielo toda la noche para la precipitación de las proteínas y se centrifugaron a 10000 rpm durante 25 min. Posteriormente se lavaron dos veces con un tampón de lavado que contenía Tris-HCl 10mM pH 8, acetona 70%, etanol 10% y azul de bromofenol para permitir detectar las trazas de TCA al virar el color a amarillo. Se centrifugaron de nuevo a 10000 rpm durante 10 min y tras eliminar el sobrenadante se guardaron a -20°C si el uso iba a ser próximo o a -80°C si se iban a almacenar durante una larga temporada. Para su utilización, se resuspendieron en función del peso seco en Tris HCl 10mM pH 7.5 y se prepararon en condiciones desnaturalizantes usando tampón de ruptura de proteínas (60mM Tris HCl pH 8, 0.1% SDS, 5% glicerol (v/v), 0.005% azul de bromofenol (Hopwood 1985), y DTT como agente reductor y se incubaron a 95 °C durante 5 min. Posteriormente las proteínas se separaron en geles SDS-Poliacrilamida al 10% para la  $\alpha$ -amilasa y al 12% para agarasa a un voltaje de 130V y se tiñó con Coomassie brillante G-250 al 0.25% durante dos horas. Se destiñó con solución de desteñido (ácido acético 10% v/v y metanol 10% v/v) durante una hora.

Cuando fue necesario se realizaron ensayos de “Western-blot”. Los geles se transfirieron a membranas de polivinildeno difluorado (PVDF; Immobilon-P, Millipore) en semiseco (electrotransferidor de BioRad), durante 20 minutos, 250V y 0,3A a temperatura ambiente. Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con 5% de leche descremada en PBS. Se comprobó la correcta transferencia tiñendo brevemente las membranas con rojo Ponceau al 0,15% y lavándolas a continuación con agua destilada. La inmunodetección se realizó con los anticuerpos primarios policlonales anti-agarasa (anti-DagA) en proporción 1:6000, anti-xilanasas C (Anti-XInC, 1:2000) y anti- $\alpha$ -amilasa (anti-Ami, 1:2500) en solución de lavado (leche descremada al 1% y Tween-20 0,1% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó la proteína A-HRP (Zymed Laboratories Inc.) en proporción 1:10000. La actividad peroxidasa se detectó

usando el sistema de detección de ECL (Amersham). Las membranas se expusieron a películas de rayos X (A plus, Konika Minolta y BioMax XAR Film, Kodak).

Los anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot, anti-agarasa (anti-DagA), anti- $\alpha$ -amilasa (anti-Ami) y anti-xilanasac (anti-XlnC), procedían de la colección del laboratorio.

## **2.10.- Microscopía y obtención de imágenes**

Para la comprobación visual de cepas se empleó un microscopio Zeiss Axiolab HBO 50. Para la obtención de fotos de las placas Petri y autorradiografías, se utilizó una cámara digital Nikon D1X, objetivo AF MICRONIKKOR 60mm.

## RESULTADOS

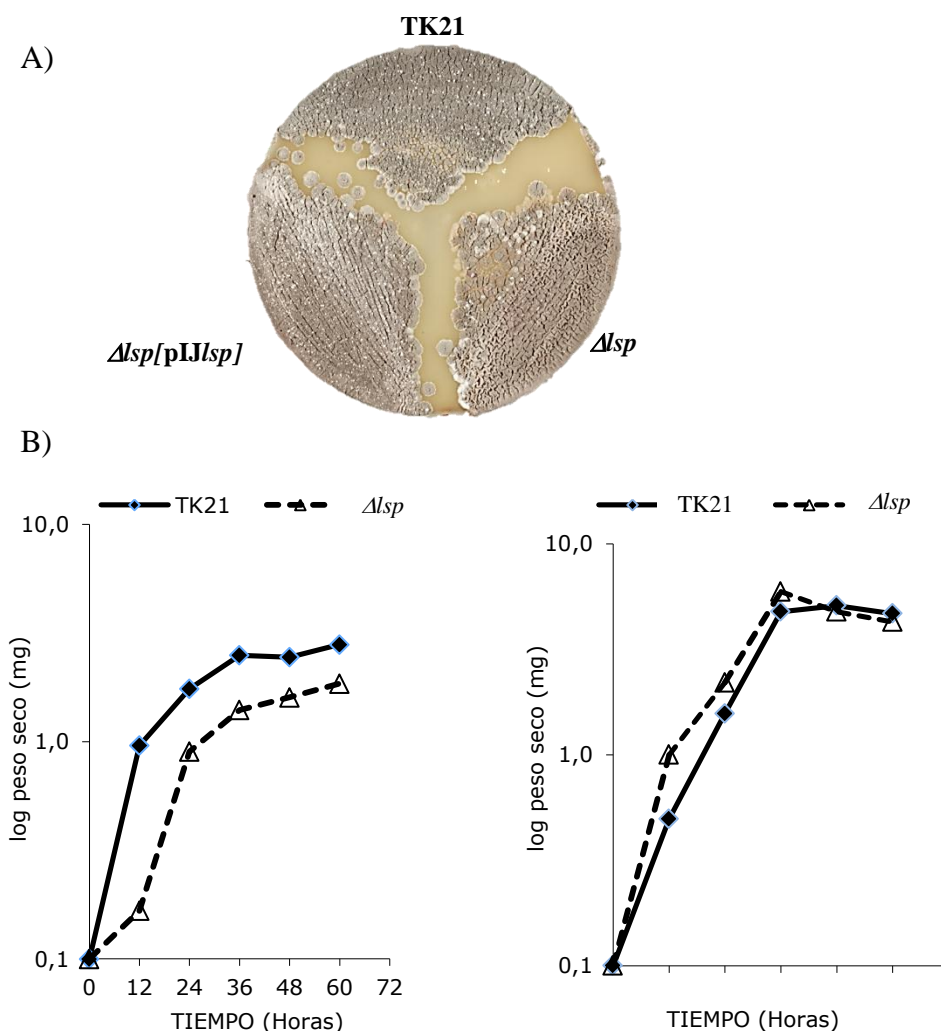




obtuvo mediante PCR amplificando con oligonucleótidos indicados en Materiales y Métodos. La sustitución del gen *lsp* por el de resistencia a apramicina se comprobó por PCR, llevando la cepa silvestre como control. La cepa resultante se denominó *S. lividans* TK21 $\Delta$ *lsp*, de ahora en adelante,  $\Delta$ *lsp*.

### 1.3.- Caracterización de la cepa mutante

En comparación con la cepa silvestre,  $\Delta$ *lsp* presenta un fenotipo no alterado de esporulación en medio sólido (Fig.8A). Se propagó el gen *lsp* en el plásmido multicopia pIJ487 en la estirpe mutante para complementar la mutación y se observó que la esporulación era normal, tal y como se esperaba.

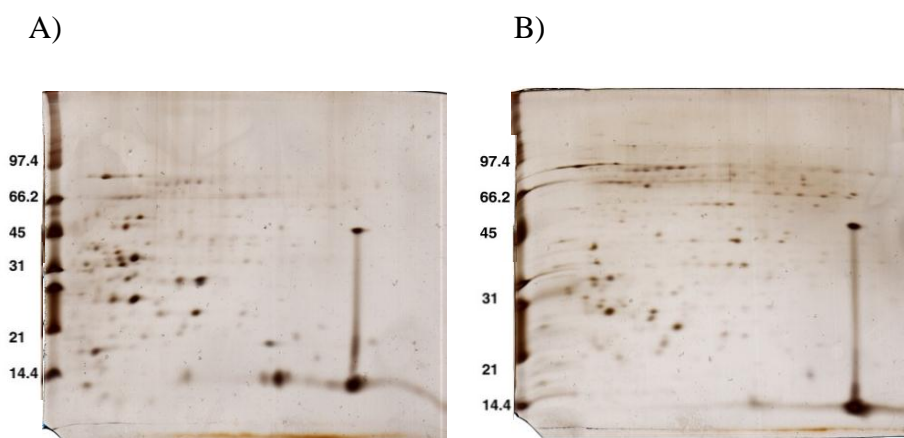


**Figura 8.** A) Crecimiento en medio sólido MS de las cepas TK21,  $\Delta$ *lsp*, y complementado,  $\Delta$ *lsp*[pIJ*lsp*]. B) Crecimiento de TK21 frente a  $\Delta$ *lsp* en medio mínimo definido NMMP (izquierda) y comparación del crecimiento de TK21 y  $\Delta$ *lsp* conteniendo el gen *lsp* clonado en pIJ487 (derecha).

En medio líquido NMMP, *Δlsp* manifiesta una tasa de crecimiento ligeramente inferior a la de la cepa silvestre (Fig. 8B) que se corrige cuando el gen *lsp* se propaga en multicopia (Fig 8B). En medio YEME, aparte de un ligero retraso con respecto a la cepa silvestre, no se observaron diferencias significativas.

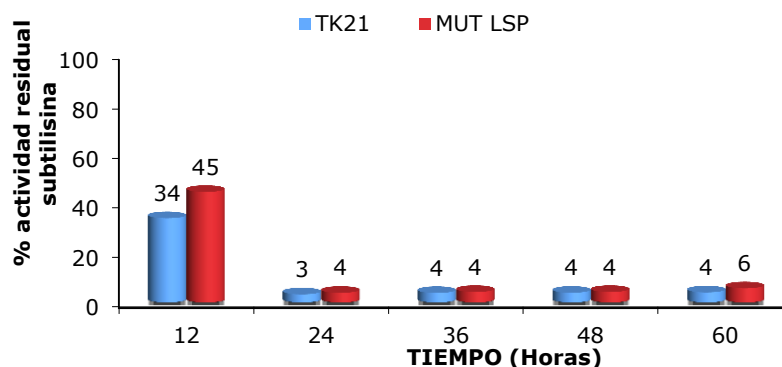
#### 1.4.- Análisis de proteínas extracelulares mediante electroforesis bidimensional

Normalmente las pre-lipoproteínas sustrato de la acción enzimática de Lsp se verían afectadas por su ausencia y podría esperarse una carencia de las mismas por un posible defecto en su procesamiento, si bien quedan, una vez procesadas, ancladas en la membrana. La figura 9 muestra el patrón de proteínas perteneciente a los sobrenadantes de cultivos en fase exponencial tardía de crecimiento. La comparación entre el patrón de proteínas extracelulares de la estirpe silvestre y la mutante, no revela grandes diferencias, ni siquiera en lo que al inhibidor de subtilisina se refiere ya que las isoformas del inhibidor de subtilisina son fácilmente identificables en geles bidimensionales (Escutia y col., 2006).



**Figura 9.** Secretoma correspondiente a las 24 horas de crecimiento de TK21 (A) y *Δlsp* (B). El marcador de tamaños moleculares expresado en kDa se indica en el margen izquierdo de cada gel.

Como se puede observar en la figura 10, el efecto de la mutación no parece ir en detrimento de la actividad del inhibidor de subtilisina ya que no se aprecian diferencias significativas entre la cepa silvestre y *Δlsp*. Los valores de la cepa silvestre a las 12 horas reflejan una actividad residual de subtilisina algo más baja que en el caso del mutante, lo que indicaría una ligera mayor cantidad de inhibidor secretado por parte de TK21, siendo del mismo orden a tiempos más tardíos de crecimiento.



**Figura 10.** Porcentaje de actividad residual de subtilisina después de incubación con los extractos de sobrenadantes de los cultivos de TK21 y *Δlsp* a lo largo del crecimiento. Ante un mayor porcentaje de subtilisina residual, la cantidad de inhibidor de subtilisina (SCO0762, Stt1) presente en el extracto es menor. Se considera el 100% de actividad la máxima actividad detectada de subtilisina comercial.

## 1.5.- Estudio transcripcional del mutante *Δlsp*

### Hibridación de micromatrices de ADN de genoma completo

Con el fin de esclarecer más detalladamente los posibles efectos resultantes de la mutación, se recurrió al uso de análisis transcripcional de la cepa mutada por hibridación de su ARNm con micromatrices de ADN de genoma completo para así determinar el patrón de expresión génica en el mutante.

La comparación de los datos registrados en la cepa mutante con los equivalentes en la cepa silvestre permite inferir el efecto transcripcional global de la modificación genética introducida, pudiendo así identificar los genes afectados. Solamente se tuvieron en cuenta aquellos resultados de hibridación que presentaban un valor de probabilidad (“valor p”) inferior a 0,05, lo cual quiere decir que la fiabilidad del dato es de al menos el 95%. Las variaciones en las cantidades de transcritos presentes en *Δlsp* frente a la cantidad de esos mismos transcritos en la cepa silvestre TK21, fue considerada como significativa cuando presentaba una diferencia positiva o negativa en un factor de 2,5 (“Fold Change”, FC desde este momento). Únicamente se tomaron en consideración aquellos casos en los que la pareja de oligonucleótidos presentes en la micromatriz para cada gen cumplieran estas dos condiciones.

Los resultados para el tiempo de crecimiento en fase exponencial tardía (24 horas) se exponen en las tablas 8 y 9. Se obvian los resultados de las correspondientes micromatrices de fase estacionaria (36 horas) ya que no evidenciaron diferencias significativas.

En la tabla 8 se relacionan los escasos genes cuyo umbral de expresión diferencial fue positivo con respecto al de la estirpe salvaje. Buena parte de los 18 genes afectados está relacionada con el metabolismo primario.

**Tabla 8. Genes regulados positivamente en la cepa mutante *lsp* (24 horas)**

GEN	RATIO <i>Δlsp</i> /TK21	ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL	FUNCIÓN ANOTADA
<b><u>METABOLISMO 1º</u></b>			
SLI0315	4,87	SLI0315	Probable descaboxilasa. Biosíntesis de aa (Lys)
SLI0865	2,5	SLI0865	Posible proteína integral de membrana.
SLI1866	3,31	SLI1866-1867	Probable enzima condensadora.
SLI2779	7,74	SLI2779	acdH, acil-CoA deshidrogenasa.
SLI3073	2,82	SLI3071-3073	hutU, urocanato hidratasa. Metabolismo de His
SLI3663	3,26	SLI3662-3663	Posible proteína de membrana.
SLI3958	3,13	SLI3956-3959	Proteína ABC transportadora. Bomba de resistencia a antibióticos
SLI3966	3,8	SLI3963-3966	Proteína hipotética secretada.
SLI5676	7,32	SLI5676	abT, probable 4-aminobutirato aminotransferasa.
SLI5679	3,37	SLI5679	Metabolismo de aa
SLI7647	2,53	SLI7647	Probable proteína de unión al calcio. Proteína citoplasmática
SLI7701	4,18	SLI7700-7701	2-metilgeranil difosfato sintasa, en operón con una metilisoborneol sintasa
<b><u>METABOLISMO 2º</u></b>			
SLI4974	4,44	SLI4974	Posible deaminasa, <i>bldA</i> dependiente.
SLI6073	2,71	SLI6073	geoA, posible ciclasa
<b><u>OTROS</u></b>			
SLI3662	3,49	SLI3662-3663	Proteína hipotética
SLI3965	3,93	SLI3966-66	Proteína hipotética conservada.
SLI4440	3,065	SLI4440	Proteína hipotética
SLI6164	2,63	SLI6164	Proteína hipotética

Los genes cuya expresión aparece regulada negativamente hacen un total de 70. Gran parte de estos genes están relacionados con la biogénesis y funciones ribosomales. Además de los genes ribosomales se detectaron otros genes de metabolismo primario que se encuentran asociados a la “stringent response” en *S. coelicolor* (Hesketh y col., 2007), de forma que la mutación en *lsp* parece disparar este tipo de respuesta. Los genes de la “stringent response” están reseñados en la tabla 9. Un segundo grupo de genes desactivados, se han descrito como parte del regulón sigmaU (Gordon y col., 2008), cuyo gen también está desactivado. Estos genes aparecen también relacionados en la tabla 9. Algunos genes que codifican la síntesis de proteínas extracelulares están regulados por sigmaU. Se han encontrado otros genes para proteínas extracelulares que se han agrupado convenientemente en la tabla 9.

Se halla también desactivado de forma notable el gen de una superóxido dismutasa, relacionada con el estrés oxidativo.

Aparece un operón con función anotada de genes conectados con el metabolismo del glutamato, *gluA*, *gluB*, *gluC*, *gluD*, con una expresión disminuída entre 2 y 3 veces. Estos genes constituyen un transportador tipo ABC. El glutamato podría formar parte de la maquinaria necesaria para la regulación del nitrógeno (Yasumura y col., 2008).

Los genes *cox* que están relacionados con proteínas integrantes de la citocromo C oxidasa, se encuentran igualmente desactivados. Estos genes son por tanto necesarios para la función de los citocromos como aceptores de electrones.

**Tabla 9. Genes regulados negativamente en la cepa mutante *lsp* (24 horas)**

GEN	RATIO $\Delta lsp/TK21$	ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL	FUNCIÓN ANOTADA
<b><u>METABOLISMO 1º</u></b>			
<b>Biogénesis y función ribosomal</b>			
SLI3124	-2,6	SLI3124	Proteína ribosomal
SLI3425	-2,84	SLI3425	rpsR2, proteína ribosomal
SLI3908 *	-3,87	SLI3908-3909	rpsR, proteína ribosomal
SLI3909	-2,63	SLI3908-3909	rplI, 50S proteína ribosomal
SLI4648	-3,28	SLI4648	rplK, 50S proteína ribosomal
SLI4652	-2,68	SLI4652	rplJ, 50S proteína ribosomal
SLI4659 *	-3,41	SLI4659-5660	rpsL, 30S proteína ribosomal
SLI4660 *	-3,51	SLI4659-4660	rpsG, 30S proteína ribosomal
SLI4701	-5,33	SLI4701-4721	rpsJ, 30S proteína ribosomal
SLI4702	-3,09	SLI4701-4721	rplC, 50S proteína ribosomal
SLI4703	-2,65	SLI4701-4721	rplD, 50S proteína ribosomal
SLI4704 *	-3,5	SLI4701-4721	rplW, 50S proteína ribosomal
SLI4705 *	-2,65	SLI4701-4721	rplB, 50S proteína ribosomal
SLI4706	-4,41	SLI4701-4721	rpsS, 30S proteína ribosomal
SLI4708 *	-3,26	SLI4701-4721	rpsC, 30S proteína ribosomal
SLI4709 *	-3,53	SLI4701-4721	rplP, 50S proteína ribosomal
SLI4710 *	-3,88	SLI4701-4721	rpmC, 50S proteína ribosomal
SLI4712	-4,15	SLI4701-4721	rplN, 50S proteína ribosomal
SLI4713	-3,48	SLI4701-4721	rplX, 50S proteína ribosomal
SLI4714	-4,2	SLI4701-4721	rplE, 50S proteína ribosomal
SLI4715	-4,19	SLI4701-4721	rpsN, 30S proteína ribosomal
SLI4716 *	-3,37	SLI4701-4721	psH, 30S proteína ribosomal
SLI4717	-3,71	SLI4701-4721	rplF, 50S proteína ribosomal

SLI4718	-2,73	SLI4701-4721	rplR, 50S proteína ribosomal
SLI4719	-3,56	SLI4701-4721	rpsE, 30S proteína ribosomal
SLI4720	-3,98	SLI4701-4721	rpmD, 50S proteína ribosomal
SLI4721 *	-3,26	SLI4701-4721	rplO, 50S proteína ribosomal
SLI4725	-3,41	SLI4725	infA, factor de iniciación de traducción
SLI4726 *	-2,86	SLI4726	rpmJ, 50S proteína ribosomal
SLI4727	-2,98	SLI4727	rpsM, 30S proteína ribosomal S13
SLI4728	-2,94	SLI4728	rpsK, 30S proteína ribosomal S11
SLI4734	-3,3	SLI4734-4735	rplM, 50S proteína ribosomal L13
SLI5359	-2,59	SLI5359	rpmE3, 50S proteína ribosomal L31
SLI1773 *	-3	SLI0179-0181	Probable Ala deshidrogenasa
SLI4808 *	-2,58	SLI4808-0489	sucC, succinil CoA sintetasa
SLI1491	-2,67	SLI1491-90	efp, factor P de elongación
<b>Otros genes</b>			
SLI0247	-2,8	SLI0247	Posible proteína asociada a membrana
SLI2150 *	-2,80	SLI2150-2148	qcrC, subunidad hemo-vinculante de citocromo C
SLI2151	-3,44	SLI2150-2148	cox3, subunidad III de citocromo c oxidasa
SLI2155	-2,58	SLI2155-2154	cox1, subunidad I de citocromo c oxidasa
SLI2156	-3,26	SLI2156-2154	cox2, subunidad II de citocromo c oxidasa.
			Fosforilación oxidativa
SLI3194*	-2,7	SLI3194	Posible lipoproteína
SLI0393	-2,66	SLI0393	Posible transferasa
SLI4789	-3,33	SLI4789	Posible proteína integral de membrana
SLI5032 *	-4,24	SLI5032-5031	ahpC, alquil hidroperóxido reductasa
SLI5123	-4,10	SLI5123-5124	Posible proteína integral de membrana
SLI5254	-5,11	SLI5254	sodN, superóxido dismutasa
SLI5281	-2,68	SLI5281	probable 2-oxoglutarato deshidrogenasa
SLI5650	-3,40	SLI5650	Posible proteína de membrana
SLI5774	-3,17	SLI5774-5775	gluD, probable glutamato permeasa
SLI5775	-2,75	SLI5774-5775	gluC, probable glutamato permeasa
			gluB, probable proteína de unión a glutamato
SLI5776 *	-3,98	SLI5774-5775	gluA, probable proteína ABC captadora de glutamato
SLI5777	-3,78	SLI5774-5775	
SLI6655	-2,97	SLI6655	ribA2, GTP ciclohidrolasa II
<b><u>SIGMA U</u></b>			
SLI0644	-2,57	SLI0644	Posible proteína de membrana
SLI0930	-7,08	SLI0930	Posible lipoproteína
SLI2207	-3,03	SLI2207	Proteína hipotética secretada
SLI2217	-6,71	SLI2217	Proteína hipotética secretada
SLI2408	-2,58	SLI2408	Posible aminotransferasa
SLI2954	-5,03	SLI2954	sigU, factor sigma de la ARN polimerasa

---

SLI6650	-3,18	SLI6650-6653	Proteína hipotética
---------	-------	--------------	---------------------

**PROTEÍNAS DE SECRECIÓN**

SLI0736	-3,39	SLI0735-0738	Posible proteína secretada
SLI1121	-2,9	SLI1121	Posible proteína secretada
SLI6197	-4,12	SLI6197	Posible proteína secretada
SLI7657	-11	SLI7657	Posible proteína secretada
SLI5029	-3	SLI5029	Posible proteína secretada

**PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS**

SLI7658	-4,55	SLI7657-7658	Proteína hipotética
SLI4252	-3,14	SLI4253-4251	Proteína hipotética conservada
SLI4253	-3,12	SLI4253-4251	Proteína hipotética conservada
SLI4999	-3,305	SLI4999	Proteína hipotética

---

\* Genes potencialmente regulados por ppGpp (Hesketh y col; 2007).

**PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)**

En la hibridación de micromatrices no se observa la desactivación previsible del gen *lsp* al estar deletado, por ello se recurre al análisis con qRT-PCR, con el fin de comprobar la ausencia efectiva de transcrito. El dato obtenido por qRT-PCR fue de -22016, coherente con la ausencia total del gen en la estirpe mutante (Tabla 10).

La disminución del nivel de expresión de genes ribosomales y otros genes relacionados con el metabolismo primario están descritos que forman parte de la “stringent response”, que viene mediada por la síntesis de ppGpp catalizada por una pirofosfoquinasa de GTP denominada RelA y cuya síntesis está determinada en *S. coelicolor* por el gen *SCO1513* (Hesketh y col., 2007). Ya que en hibridación de micromatrices no se ha podido detectar diferencia en la expresión de *relA*, se ha analizado por qRT-PCR comprobándose que dicho gen estaba activado en la cepa *Δlsp* (tabla 10). Su análisis revela una activación del doble respecto a la cepa silvestre.

Análisis por espectrometría de masas en tándem realizados en nuestro laboratorio, permitieron identificar una serie de proteínas de secreción mayoritarias (S. Gullón y R.P. Mellado, resultados no publicados), cuyos genes fueron analizados por qRT-PCR. Los resultados indican una desactivación de los genes mucho más evidente que la observada en la hibridación con micromatrices. Para todos estos genes, los valores de micromatrices están por debajo del umbral de selección, aunque concordantes con la desactivación de la expresión de los mismos.



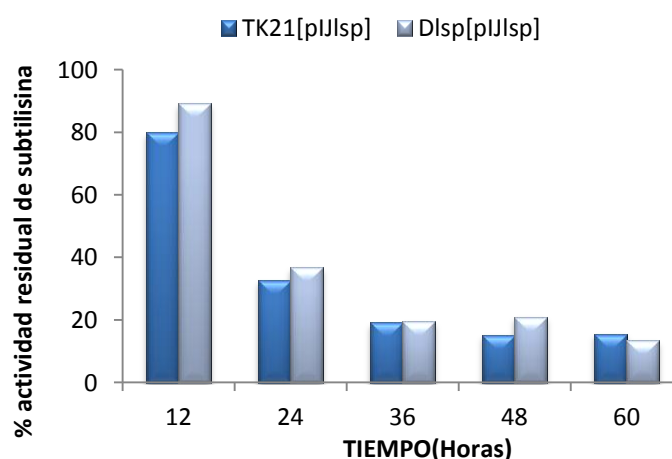
**Tabla 10. Genes afectados en la cepa mutante *lsp* (24 horas)**

GEN	MICROMATRICES	qRT-PCR	FUNCIÓN ANOTADA
SLI2074	-1,31	-22016,78	<i>lsp</i> , probable peptidasa señal
SLI1513	-1,07	2,73	<i>relA</i> , GTP pirofosfokinasa
SLI0297	-1,155	-19,76	Posible proteína secretada
SLI1860	-1,64	-6,96	Posible proteína secretada
SLI2001	-1,17	-32,09	Posible proteína secretada
SLI2116	-1,26	-21,72	Posible proteína secretada
SLI6197	-4,12	-7,64	Posible proteína secretada

### 1.6.- Construcción de la cepa sobreproductora del gen *lsp*

Dado que el efecto de la mutación *lsp* en la expresión global era transitorio, se comprobó si la sobreexpresión del gen podría tener algún efecto en la bacteria.

La secuencia de ADN que determina la síntesis de la proteína Lsp se clonó en el plásmido de alto número de copias pIJ487 como se indica en Materiales y Métodos. Con esta construcción se complementó el mutante  $\Delta lsp$ , dando como resultado *S. lividans* TK21  $\Delta lsp$ [pIJ*lsp*]. Ésta se comparó con la cepa isogénica *S. lividans* TK21[pIJ*lsp*], observándose la recuperación del crecimiento en medio líquido (Fig. 8B). No se observaron diferencias en la actividad del inhibidor de subtilisina, como por otra parte era esperable (Fig. 11).



**Figura 11.** Actividad residual de subtilisina en  $\Delta lsp$ [pIJ*lsp*] y en TK21[pIJ*lsp*]. Ante un mayor porcentaje de subtilisina residual, la cantidad de inhibidor de subtilisina (SCO0762, Sti1) presente en el extracto es menor.

La cepa TK21[pIJ*lsp*] se comparó con la cepa isogénica, TK21[pIJ487], previamente obtenida por medio de la transformación de *S. lividans* con el plásmido pIJ487 sin inserto, y se observó que no había diferencia en la esporulación en MS como en el caso de la estirpe *Δlsp*. Los geles bidimensionales de proteínas extracelulares tampoco revelaron diferencia alguna (no mostrado). Se puede afirmar que la propagación en multicopia del gen *lsp* no produce diferencias en el crecimiento ni en sólido ni en líquido respecto a la cepa silvestre TK21.

## 2.- RUTAS DE SECRECIÓN SEC Y TAT

### 2.1.- Construcción y caracterización de la cepa mutante en el gen *tatC* de *S. lividans* TK21

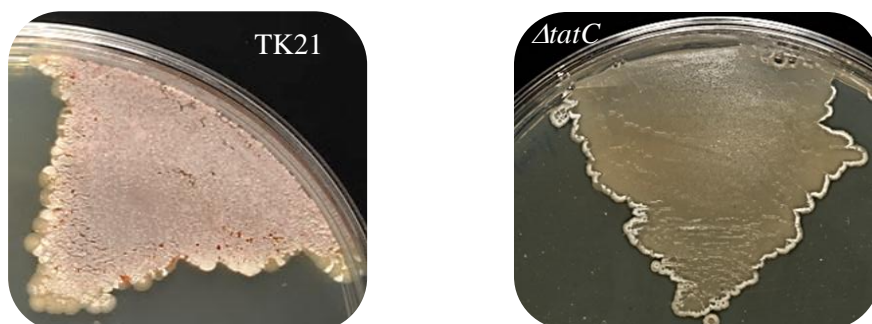
Las proteínas secretadas por la ruta Tat lo hacen en conformación plegada, por lo tanto es interesante interferir en esta ruta para observar los efectos que se producen en la secreción.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio habían demostrado que la agarasa, producto del gen *dagA* de *S. coelicolor*, era secretable vía Sec (Parro 1994). No obstante, existen evidencias más recientes que indican que la agarasa puede secretarse de forma muy eficiente por la vía Tat, (Widdick y col., 2006). Con el objeto de caracterizar mejor la secreción de agarasa se procedió, por medio del método Redirect, a la obtención de un mutante en la ruta alternativa Tat, en el que se sustituyó el gen *tatC* por el gen de resistencia a apramicina.

Para la obtención del mutante en *tatC* se abordó la misma estrategia que en el caso del mutante *lsp*. Se deletionó el gen *tatC* y se sustituyó por el gen de resistencia a apramicina como se describe en Materiales y Métodos.

Una vez se consiguió el mutante, *S. lividans* TK21 $\Delta$ *tatC*, ( $\Delta$ *tatC* a partir de este momento), se procedió al análisis de su comportamiento en medio sólido y líquido. El fenotipo de *S. lividans* deficiente en TatC en medio MS en placa es deficitario en cuanto a esporulación. Cuando se siembra  $\Delta$ *tatC* en medio sólido, su esporulación tiene lugar pero mucho después de que lo haya hecho la cepa silvestre. Este comportamiento es equivalente al de *Streptomyces coelicolor* cuando ha sufrido la misma mutación

genética (Widdick y col., 2006). Estos eventos sugerirían la importancia de *tatC* en el ciclo vital de la bacteria.



**Figura 12.** Crecimiento en medio sólido MS de las cepas TK21 y *ΔtatC* tras 5 días de incubación a 30°C.

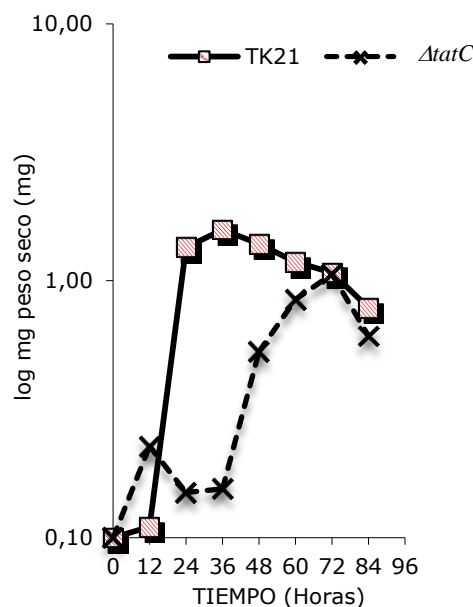
El mutante *ΔtatC* de *S. coelicolor* no es cultivable en medio líquido (Widdick y col., 2006). El mutante de *S. lividans* tiene dificultades para crecer en medio YEME con todos sus componentes, sin embargo la supresión de sacarosa de la receta y sucesivos pases de enriquecimiento han permitido su cultivo en medio líquido YEME y de ahí su propagación posterior en medio líquido definido NMMP.

Tras 48 horas de incubación a 30°C y en agitación a 250 rpm en medio YEME sin sacarosa, el aspecto de este mutante no es tan homogéneo como el de la cepa silvestre TK21, siendo más grumosos los agregados que forma. Después de los sucesivos pases de adaptación del mutante al crecimiento líquido, el crecimiento es menos vigoroso que el de la cepa salvaje, aunque se pueden distinguir las clásicas fases de crecimiento (Fig. 13).

Para ahondar en los efectos inducidos por la mutación y avanzar en la caracterización de la cepa mutante, se utilizó la misma estrategia que en el caso del mutante *Δlsp* y se realizó un estudio transcripcional de la cepa modificada frente a la cepa silvestre.

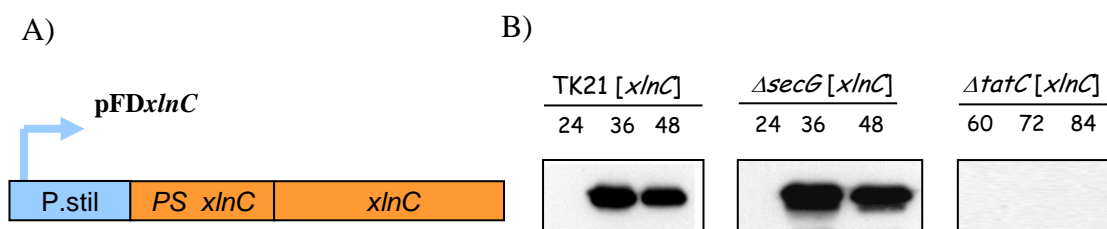
Dado que la cantidad de ARN extraída lograda en el caso del mutante no es muy abundante, se llevó a cabo únicamente análisis por PCR en tiempo real y se prescindió de la hibridación de micromatrices. Para el análisis se tuvo en cuenta el retraso que se produce en el crecimiento de *ΔtatC* extrayéndose el ARN en los momentos en los que alcanzaban los tiempos metabólicos equivalentes entre la cepa mutante y la silvestre. Así, a las 24 y 36 horas de crecimiento de la cepa TK21 les corresponden las 60 y 72

horas del mutante en *tatC* respectivamente. El análisis de expresión del gen *tatC* indicó una disminución del transcrito de casi 113 veces en la cepa mutante frente a la salvaje en los primeros tiempos y de -73 en los segundos, con lo que se puede afirmar que la delección del gen *tatC* fue satisfactoria.



**Figura 13.** Representación del crecimiento de TK21 frente a  $\Delta tatC$  en medio NMMP

La xilanasa C, proteína específica de la ruta Tat, cuyo gen está clonado en el vector pFD666 bajo el control del promotor del gen *stiI* (Denis y Brzezinski, 1992) se ha propagado en la cepa silvestre, dando lugar a la cepa *S. lividans* TK21[pFDxlnC], y en los mutantes alterados en la ruta Sec, ( $\Delta secG$ ; Palomino y Mellado, 2006) y en la ruta Tat ( $\Delta tatC$ ), generándose las cepas *S. lividans*  $\Delta secG$ [pFDxlnC] ( $\Delta secG$ [xlnC] a partir de este momento) y *S. lividans*  $\Delta tatC$  [pFDxlnC] ( $\Delta tatC$ [xlnC] a partir de este momento) respectivamente. Tras la obtención de las proteínas precipitadas tal y como se ha referido en Materiales y Métodos, la xilanasa C extracelular se detectó por Western blot, lo que permite observar que se acumula extracelularmente a tiempos más tardíos de crecimiento en la estirpe salvaje y  $\Delta secG$  y que su secreción no tiene lugar en  $\Delta tatC$ , como se esperaba. Como se observa en la figura, se aprecia que su secreción no está alterada por la mutación en *secG* ya que esta proteína es exclusiva de la ruta Tat (Fig. 14).



**Figura 14.** A) Híbrido pFDxlnC. B) Secreción de xilanas a las 24, 36 y 48 horas de crecimiento en la cepa silvestre, en  $\Delta secG$  y en  $\Delta tatC$ . Los tiempos 60, 72 y 84 de  $\Delta tatC$  corresponden a las 24, 36 y 48 de TK21 y  $\Delta secG$ . PS: péptido señal. P: promotor.

## 2.2.Utilización de la ruta Tat

Es conocida la capacidad de la agarasa de dirigirse por la ruta Tat, aunque trabajos previos efectuados en nuestro laboratorio apuntaban a la capacidad de la misma a ser secretada además, por la ruta mayoritaria de secreción Sec. Con objeto de comprobar si existen proteínas capaces de ser secretadas por ambas rutas de secreción, se han empleado los mutantes  $\Delta tatC$  y *S. lividans* TK21 $\Delta secG$  ( $\Delta secG$  desde este momento)

Se ha analizado la producción de  $\alpha$ -amilasa, específica de la ruta Sec y la de agarasa así como distintas proteínas quiméricas de agarasa o  $\alpha$ -amilasa cuyos péptidos líderes deberían dirigir su secreción por una u otra ruta en las estirpes salvaje y en los mutantes de cada ruta. Esta comparación se ha realizado en condiciones de sobreproducción. La presencia extracelular de las distintas proteínas se evidenció por ensayos de Western blot en los que se utilizaron anticuerpos policlonales contra las regiones maduras de las proteínas empleadas. Las proteínas  $\alpha$ -amilasa y agarasa están clonadas en el plásmido multicopia pIJ486 y se expresan en *S. lividans* TK21 bajo el control de su propio promotor (plásmidos pAMI11 y pAGAs5 respectivamente; Isiegas, 1999; Parro y Mellado, 1994).

Se construyó un híbrido en el que se combinaron el promotor del gen *dagA*, codificante de agarasa, y el péptido señal de la  $\alpha$ -amilasa para dirigir la secreción agarasa. Posteriormente, esta construcción se clonó en un plásmido de alto número de copias, pAGA500, que contenía la región codificante de los últimos seis aminoácidos del péptido señal y la parte madura de la agarasa, dando como resultado final el plásmido pAGA502. Por trabajos previos del laboratorio se tenía conocimiento de que, en el caso de la agarasa, la proteína alcanza un pico máximo de secreción en el medio de

cultivo de la cepa sobreproductora TK21[pAGAs5] en la fase de estacionaria (Parro y Mellado., 1994; Parro y Mellado., 1998).

Con la nueva construcción se transformaron *S. lividans* TK21 y los dos mutantes  $\Delta tatC$  y  $\Delta secG$  y los transformantes adecuados se seleccionaron directamente en la placa de regeneración de protoplastos por su hundimiento en el agar, seguido de una minipreparación de plásmidos para confirmar la transformación. El crecimiento de estas tres cepas se llevó en paralelo. La producción de agarasa en los tres transformantes se comparó con la de las correspondientes cepas isogénicas de pAGAs5.

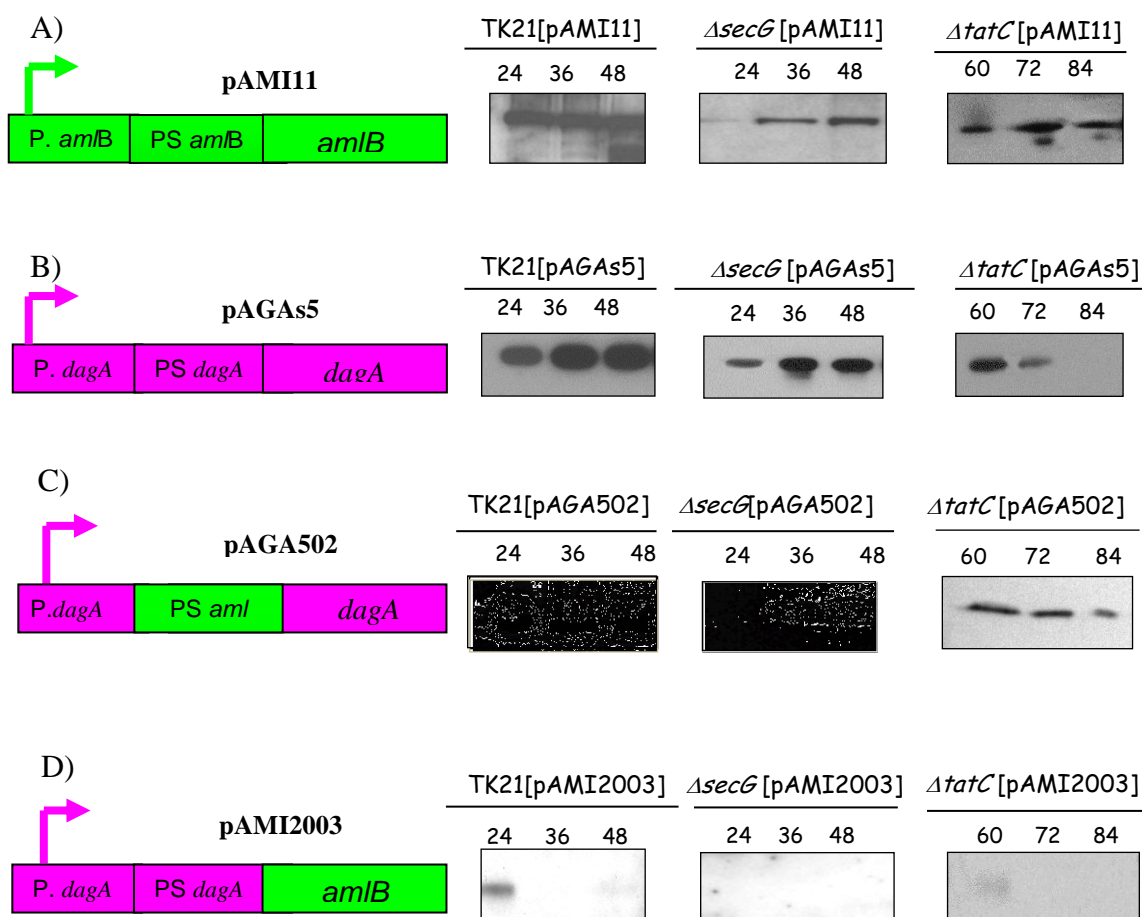
Como se muestra en la figura 15, en la estirpe silvestre TK21[pAGAs5] la agarasa aparece al final de la fase exponencial para continuar secretándose en la fase estacionaria donde se observa un marcado acúmulo de la proteína. Algo similar ocurre en el mutante en *secG*, en el cual la secreción de agarasa no parece estar afectada en exceso por la mutación. La cantidad de enzima que reacciona con su anticuerpo es, a primera vista, algo menor que en TK21 en la fase exponencial, pero no se trata de una reducción dramática. Esto sugiere que una proporción elevada de la enzima es secretada por la ruta Tat (Widdick y col., 2006). En el mutante *tatC*, la secreción de agarasa es muy deficiente y alcanza su máximo en fase exponencial. La mutación en *tatC* conlleva el bloqueo de la ruta Tat, y por tanto las proteínas que la utilicen, supuestamente permanecerían en el interior de la célula o bien podrían ser secretadas a través de otra vía como la ruta Sec.

En el caso de la quimera pAGA502, la secreción de agarasa está dirigida por el péptido líder de  $\alpha$ -amilasa, una proteína típica Sec. El análisis de Western blot de la cepa silvestre mostró la aparición de la agarasa desde las 24 horas de cultivo.

En el mutante  $\Delta secG$ , el péptido líder de la  $\alpha$ -amilasa debería dirigir a la agarasa por la ruta Sec, como parece que efectivamente ocurre, aunque en una pequeña cantidad debido a que la mutación enlentece considerablemente el proceso de translocación de la ruta Sec. Sin embargo, en referencia al mutante *tatC*, es posible ver que la cantidad de agarasa secretada al exterior es mayor al utilizar la ruta Sec.

En el laboratorio se había construido un vector para la expresión de proteínas utilizando los promotores y el péptido señal de la agarasa denominado pAGAs20 (Parro y Mellado., 1994). En este vector se incorporó en fase con el péptido líder de la agarasa la región que codifica la parte madura de la  $\alpha$ -amilasa dando como resultado el plásmido pAMI2003 (Fig. 15). El plásmido se propagó, de igual modo que en los casos

anteriores, en las cepas  $\Delta secG$ ,  $\Delta tatC$  y en TK21 para observar el efecto causado por la combinación del péptido líder de agarasa en la secreción de  $\alpha$ -amilasa en comparación con la producción de  $\alpha$ -amilasa con su propio péptido líder (pAMI11) en las mismas cepas.



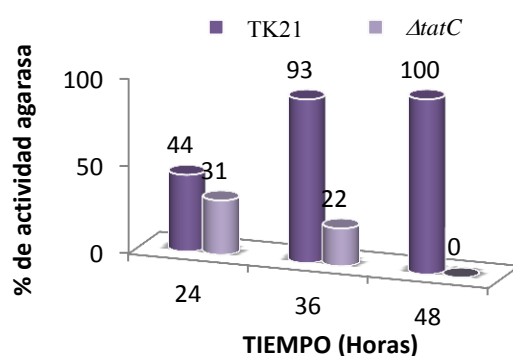
**Figura 15.** (A) pAMI11 y secreción de  $\alpha$ -amilasa. (B) pAGAs5 y secreción de agarasa (C) Híbrido pAGA502 y secreción de agarasa dirigida por el péptido señal de  $\alpha$ -amilasa. (D) pAMI2003 y secreción de  $\alpha$ -amilasa dirigida por el péptido señal de agarasa. En los cuatro casos de secreción de las proteínas modelo se detectan en las cepas silvestre,  $\Delta secG$  y  $\Delta tatC$ . PS: péptido señal. P: promotor. Los tiempos 60, 72 y 84 de  $\Delta tatC$  corresponden a 24, 36 y 48 de la cepa silvestre y del mutante  $\Delta secG$ .

En  $\Delta secG$  la secreción de  $\alpha$ -amilasa está disminuida porque no puede salir por el translocón debido a la exclusividad que esta proteína presenta por la ruta de secreción mayoritaria, Sec. Sin embargo, a pesar de la mutación y en consonancia con trabajos previos del laboratorio, el translocón no ve comprometida del todo su función, simplemente se retrasa, permitiendo que un pequeño porcentaje de la producción de  $\alpha$ -amilasa viaje al exterior celular. Estando la secreción de la ruta Tat alterada por la mutación de su componente TatC, la secreción de una proteína exclusiva de la ruta

mayoritaria Sec, como lo es la  $\alpha$ -amilasa, ocurre de forma similar a la de la estirpe salvaje y los mutantes  $\Delta secG$  y  $\Delta tatC$  (Fig.15 A). En el recombinante pAMI2003, el péptido líder de la agarasa podría teóricamente dirigir la  $\alpha$ -amilasa por ambas rutas. La secreción de  $\alpha$ -amilasa está disminuida en *S. lividans* [pAMI2003], donde queda restringida únicamente a fase exponencial tardía y en los mutantes  $\Delta secG$  y  $\Delta tatC$ , la presencia de  $\alpha$ -amilasa es nula ( $\Delta secG$ ) o prácticamente nula ( $\Delta tatC$ ). Así, la  $\alpha$ -amilasa secretada por el péptido líder de agarasa denota la capacidad de ese péptido líder para conducir la secreción vía Sec a tiempos tempranos. La baja cantidad de  $\alpha$ -amilasa secretada no puede aparecer extracelularmente en  $\Delta secG$ , donde la secreción vía Sec está afectada y su ausencia a tiempos tardíos en la estirpe salvaje y en  $\Delta secG$  es, probablemente, debida a la estructura de la propia  $\alpha$ -amilasa, que la incapacita para ser secretada vía Sec. La actividad  $\alpha$ -amilasa detectada en la estirpe TK21[pAMI2003] es del orden del 20% de la detectada en la estirpe TK21 en el mismo tiempo de cultivo.

### Ensayo de actividad agarasa

En comparación con la actividad agarasa detectada en sobrenadantes de la cepa TK21[pAGAs5], la actividad determinada en el mutante  $\Delta tatC$  es menor. La actividad va aumentando al sobrepasar la fase exponencial del crecimiento, manteniéndose prácticamente invariable a partir de ese momento, mientras que en  $\Delta tatC$ [pAGAs5], la actividad detectada es inferior y corresponde a la fase exponencial del crecimiento.



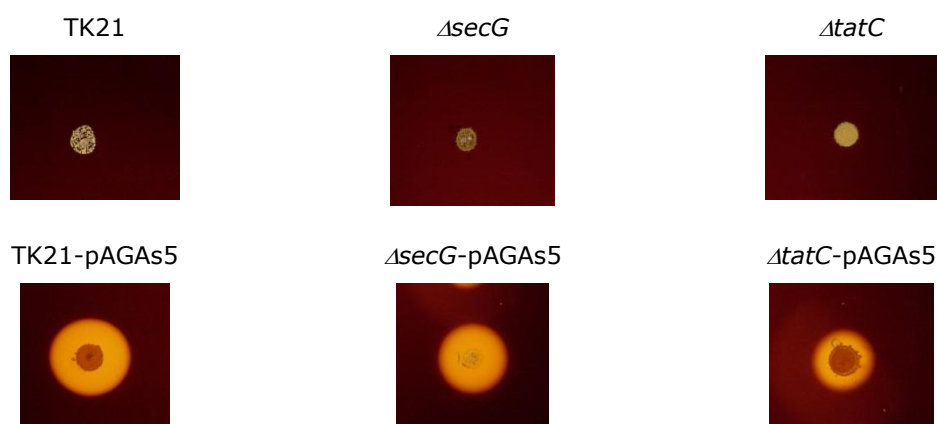
**Figura 16.** Porcentaje de actividad agarasa detectada en las cepas TK21[pAGAs5] (TK21) y  $\Delta tatC$ [pAGAs5] ( $\Delta tatC$ ). Tiempos 24, 36 y 48 horas de TK21 corresponden a 60, 72 y 84 horas de la cepa mutante isogénica.

El mutante  $\Delta tatC$  tiene dificultad para crecer en medio líquido, por ello, se transformó con el plásmido pAGAs5 y la producción de agarasa extracelular se valoró por la formación de halos en comparación con cepas productoras y no productoras de



agarasa, como control, y con la producción de agarasa del mutante  $\Delta secG$  al objeto de comprobar si la agarasa podía utilizar ambas rutas, Sec y Tat para su exporte al exterior celular en condiciones de sobreproducción.

La sobreproducción de agarasa en su forma extracelular activa confiere a las estirpes productoras un fenotipo fácilmente detectable en las colonias crecidas en medio mínimo sólido suplementado con agarosa al 1%. La producción de agarasa se puso de manifiesto por el hundimiento de las colonias en el agar y mediante tinción con una solución de lugol que revela un halo translúcido alrededor de la colonia, lo que indica la producción de azúcares reductores como resultado de la degradación del agar del medio.

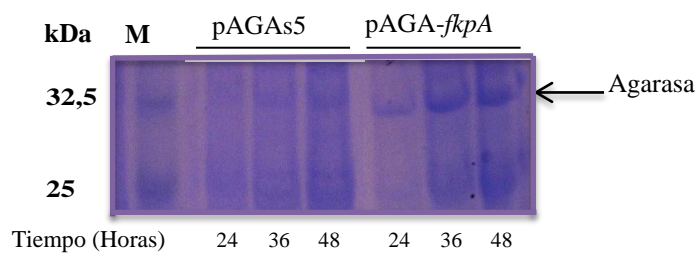


**Figura 17.** Ensayo de agarasa en placa. Se aprecian los halos alrededor de las cepas productoras de agarasa en placas de medio mínimo (NMMP).

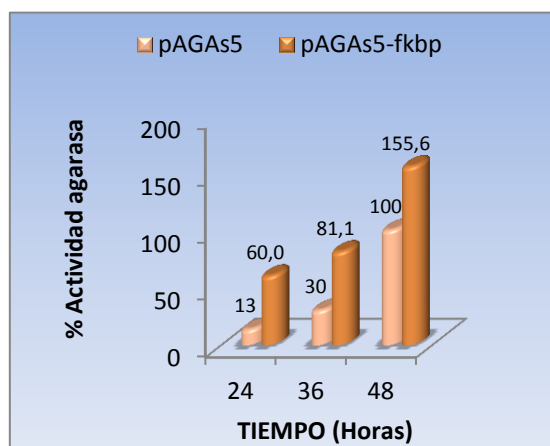
Los resultados obtenidos (Fig. 17) indican que, en efecto, la agarasa puede secretarse por ambas rutas cuando se introduce esta enzima en sobreproducción, ya que tanto en  $\Delta secG$ [pAGAs5] como en  $\Delta tatC$ [pAGAs5] aparece un halo alrededor de la colonia como consecuencia de la degradación de la agarosa por parte de la enzima. Como era de esperar en las estirpes que no contienen el gen de agarasa no se manifiesta ninguna degradación del agar del medio.



A)



B)



**Figura 19.** Representación de la actividad agarasa en el sobreproductor de dicha enzima que lleva el gen *fkpA* en multicopia para favorecer su plegamiento. A) Gel de SDS-PAGE en el que se aprecia un acúmulo de enzima. M: marcador de tamaños moleculares en kilodalton (kDa).

B) Porcentaje de actividad agarasa en las cepas sobreproductoras *S. lividans* TK21[pAGAs5] y TK21-[pAGAs5*fkpA*]. Se considera el 100% de actividad el valor más elevado obtenido en la cepa silvestre.

La figura 19A muestra un mayor acúmulo de agarasa en la cepa que tiene *fkpA* en multicopia, que se corresponde con el aumento de actividad agarasa (Fig. 19B). Estos resultados preliminares parecen confirmar la función de FkpA como foldasa extracelular de *S. lividans*.

## DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

### 1.- RESPUESTA CELULAR A LA DEPLECIÓN DEL GEN *lsp*

La adquisición por las proteínas extracelulares de un plegamiento correcto es fundamental para su estabilidad y eficiente actividad. Las proteínas incorrectamente plegadas son susceptibles de degradación por proteasas específicamente inducidas en la célula bacteriana a través de un sistema de dos componentes que de alguna manera siente la presencia acumulada de proteínas no plegadas y dispara la expresión de los genes codificantes de las correspondientes proteasas. Este mecanismo de degradación de proteínas no plegadas se conoce como “estrés por sobreproducción” y ha sido descrito en varias bacterias que son microorganismos secretores de eficiencia reconocida (Vitikainen y col., 2004). La sobreproducción de proteínas extracelulares con potencial aplicación industrial, consiste no sólo en ingeniar sistemas o bacterias anfitrionas donde esa producción se maximice, sino asegurarse de que los procesos subsiguientes a la síntesis de las correspondientes proteínas precursoras están igualmente maximizados, como son el transporte, translocación y procesado de las mismas, minimizando la posible existencia de pasos que limiten la cantidad de proteína producida presente en el exterior celular. De poco valdría asegurar la eficiente síntesis, transporte y secreción de esas proteínas si su correcto plegamiento y su actividad no se hubiesen igualmente preservado. De ahí la necesidad de asegurar que el plegamiento extracelular sea, cualitativa y cuantitativamente, efectivo, con objeto de optimizar la cantidad y calidad de la proteína sobreproducida.

La única proteína identificada como foldasa extracelular en *Streptomyces*, (SCO1639 en *S. coelicolor* y SLI1639 su equivalente en *S. lividans*) es un proteína tipo FKBP. La delección del gen que determina su síntesis, no tiene, aparentemente, fenotipo alguno y la ausencia del gen parece ser perfectamente tolerable por *S. coelicolor* (Thompson y col., 2010). La propagación en multicopia del gen *fkpA* bajo el control de su propio promotor en *S. lividans*, tampoco parece ofrecer diferencias fenotípicas con la correspondiente estirpe isogénica, sea en el crecimiento y diferenciación sea en la actividad proteolítica extracelular o en la de inhibidor de subtilisina (García, E, Palomino, C. y Mellado R.P., resultados no mostrados), situación no equivalente a la de *B. subtilis*, donde la foldasa extracelular PrsA no es dispensable y, en su ausencia, se dispara el estrés por sobreproducción. Tanto PrsA como FkpA son

lipoproteínas y el enzima encargado del procesado de su péptido líder es Lsp, la peptidasa señal tipo II. Mientras que la deficiencia de Lsp en *B. subtilis* no parece llevar emparejada ninguna deficiencia, al punto de parecer dispensable (Tjalsma y col., 1999), no ocurre así en *S. coelicolor*, donde la deficiencia en Lsp causa un desajuste importante en la translocación y eficiente procesado de lipoproteínas, aunque la expresión de los correspondientes genes no parece estar afectada (Thompson y col., 2010).

La depleción del gen *lsp* en *S. lividans*, no parece afectar marcadamente al crecimiento en medio sólido ni a la diferenciación celular, causa sólo un relativamente corto retraso en el crecimiento en medio líquido definido y, sin embargo, parece causar desajustes transcripcionales en la célula bacteriana, de forma que, cuando se consideran las posibles agrupaciones génicas en que los genes afectados están encuadrados, el número total de genes desactivados podría estimarse en 88. El análisis por hibridación de micromatrices no permitió visualizar el esperado descenso del nivel de expresión del gen *lsp*, sin embargo el análisis por qRT-PCR arrojó un descenso estimado de más de 22.000 veces en el nivel de expresión relativo, como era esperable ante la ausencia del gen *lsp* en el genoma de la estirpe mutante. No es infrecuente que la hibridación de micromatrices falle en la detección del nivel de expresión relativo de algunos genes debido al proceso de análisis estadístico a que se someten los resultados de la hibridación, teniendo que recurrir con cierta frecuencia a análisis más eficientes y cuantitativos, como qRT-PCR, aunque en este caso, seguramente es atribuible a que el oligonucleótido anclado en la micromatriz para el gen *lsp*, simplemente no sea suficientemente discriminativo en el proceso de hibridación.

De los 88 genes negativamente regulados en la estirpe de *S. lividans* deficiente en Lsp, un 45% son genes que se han descrito como involucrados en la respuesta “stringent” de *S. coelicolor* (Hesketh y col. 2007). La “stringent response” viene mediada por RelA, una pirofosfoquinasa de GTP, que es responsable de la síntesis de ppGpp, la molécula que dispara la “stringent response” en bacterias (Hesketh y col. 2007). La expresión del gen, *relA*, se encuentra activada en el mutante en *lsp*, como el análisis por qRT-PCR ha establecido. La mayor parte de estos genes modulados negativamente determinan la síntesis de proteínas ribosomales y de factores relacionados con el proceso de traducción en la síntesis peptídica. Al ser la “stringent response” típicamente disparada por depleción de aminoácidos, parece lógico que sea la

síntesis de proteínas uno de los procesos que deba verse afectado en la célula ante la carencia de precursores, y la regulación negativa de la expresión de genes involucrados en acepción de electrones, como los relacionados con el metabolismo de citocromos, en un proceso generalizado de ralentización del metabolismo primario relacionado con el crecimiento activo, que posiblemente tiene su reflejo en el retraso del crecimiento de la estirpe mutante respecto al de la estirpe salvaje cuando ambas se incuban en medio definido (Fig.8).

Es por tanto evidente que la deficiencia en Lsp provoca un estrés en la célula que alcanza también a la desactivación de hasta ocho genes que codifican proteínas extracelulares, siendo responsable de esa modulación negativa un factor sigma ( $\sigma^U$ ) en tres casos. Un subconjunto de los genes regulados negativamente en la estirpe deficiente en Lsp lo son por la desactivación de la expresión del gen *sigU*, que codifica por el factor sigmaU de acción extracitoplásmica que modula la expresión de genes relacionados con la diferenciación morfológica en *S. coelicolor* (Gordon y col., 2008). En base a secuencias conservadas en la región promotora se han descrito hasta 22 genes potencialmente regulados por sigmaU en *S. coelicolor*, de los cuales al menos 11 han podido ser comprobados experimentalmente (Gordon y col., 2008). Siete de estos genes, SCO2954 (*sigU*) entre ellos, se han podido identificar como regulados negativamente en la estirpe deficiente en Lsp, lo que sugiere que es muy posible que el nivel de expresión de todos los genes del regulón  $\sigma^U$  se encuentre afectado negativamente al estarlo el propio gen regulador, de forma que los once genes dependientes de *sigU* representarían un 12.5% de los genes negativamente regulados.

La deficiencia en la peptidasa señal tipo I mayoritaria (SipY) provoca la práctica ausencia de proteínas extracelulares en *S. lividans* (Escutia y col., 2006) y se ha determinado en nuestro laboratorio que los genes codificantes de las proteínas extracelulares más abundantes también resultan negativamente modulados en la estirpe deficiente en SipY (S. Gullón y R.P. Mellado, resultados sin publicar). La ausencia funcional de una peptidasa señal de tipo II provocaría que la foldasa potencial, la lipoproteína FkpA, no pudiera procesarse adecuadamente y, como resultado, las proteínas extracelulares serían degradadas proteolíticamente al no estar correctamente plegadas. Un mecanismo de ahorro energético podría descender o anular el nivel de transcripción de los genes que no fueran esenciales en las condiciones experimentales empleadas, de forma que tanto el gen codificante de FkpA, como el de las proteínas

extracelulares mayoritarias u otras podrían resultar negativamente modulados en la estirpe deficiente en Lsp. La expresión de los genes codificantes de las proteínas extracelulares mayoritarias, que no se había podido detectar por hibridación de micromatrices de genoma completo, se analizó por qRT-PCR y se comprobó en todos los casos la expresión de los genes estaba negativamente modulada en el mutante en *lsp* (Tabla 10).

Sólo se han detectado un reducido número de genes cuya expresión resulta activada en la estirpe deficiente en Lsp (Tabla 8), en gran parte asociados al metabolismo de aminoácidos, como quizá fuera esperable si la célula está interpretando de alguna manera que se ha producido una depleción de precursores. En cualquier caso, la respuesta celular es transitoria, y el mismo análisis de expresión génica llevado a cabo en muestras de cultivos celulares extraídas al alcanzar la fase estacionaria (36h de incubación) no permite detectar modulación positiva alguna en la estirpe deficiente en Lsp cuando se compara con la estirpe salvaje, y sólo algunos genes codificantes de proteínas ribosomales retenían la modulación negativa de su expresión, si bien en niveles más próximos a los de la estirpe salvaje (resultados no mostrados). Es posible que este efecto transitorio de la mutación en la peptidasa señal II exista en otras bacterias Gram positivas como *B. subtilis*, y no haya sido detectado, ya que la caracterización funcional del correspondiente mutante no incluyó el análisis del posible efecto en la expresión global de los genes de la bacteria y la mutación parecía ser dispensable, como ocurre en *S. lividans*.

## 2.- SECRECIÓN DE AGARASA POR LAS RUTAS TAT Y SEC

Se ha descrito que agarasa es una proteína que utiliza la ruta Tat en *S. coelicolor* habiéndose utilizado como proteína testigo para identificar péptidos líderes de tipo Tat en posibles proteínas extracelulares potenciales usuarias de esa ruta (Widdick y col., 2006). No obstante existe evidencia aportada por nuestro laboratorio de la capacidad de la pre-agarasa para utilizar la ruta Sec en condiciones de sobreproducción en *S. lividans* (Parro y Mellado, 1994; Isiegas; 1999). Los resultados obtenidos en experimentos de Western-blot con las pre-proteínas quiméricas construidas intercambiando los péptidos líderes de las proteínas modelo tipo Sec ( $\alpha$ -amilasa) o Tat (agarasa) permiten concluir que la agarasa puede, efectivamente utilizar ambas rutas de secreción cuando se sobreproduce en *S. lividans*, si bien tan sólo parece usar la ruta Sec a tiempos tempranos



de crecimiento, aunque, en ausencia de la ruta Tat funcional (estirpe deficiente en TatC), la agarasa parece ser al menos parcialmente exportable por la ruta Sec a otros tiempos de crecimiento (Fig. 15). La sustitución del péptido líder tipo Sec de  $\alpha$ -amilasa por el de la agarasa permite un reducido nivel de secreción de  $\alpha$ -amilasa en la estirpe salvaje a tiempo temprano, lo que confirma la capacidad del péptido líder de agarasa para dirigir la secreción de proteína por la ruta Sec (Fig.15). La secreción de proteínas quiméricas en la estirpe deficiente en la ruta Sec (mutante deficiente en SecG) resulta severamente afectada y sólo una pequeña cantidad de la proteína producida aparece extracelularmente, lo que se traduce en la baja presencia en el sobrenadante de la proteína modelo ( $\alpha$ -amilasa) y en la ausencia de la proteína quimérica con el péptido líder de agarasa (Fig 15).

La aparente versatilidad de agarasa para poder utilizar las dos rutas de secreción contrasta con la de  $\alpha$ -amilasa para hacer lo mismo. La razón puede ser de tipo estructural, el tamaño molecular de agarasa es menor que el de  $\alpha$ -amilasa y agarasa no tiene puentes disulfuro predecibles en su molécula, lo que no es el caso de  $\alpha$ -amilasa, que tiene hasta ocho residuos de cisteína en la proteína madura. Así, en condiciones de sobreproducción, proteínas cuya estructura no fuese muy compleja podrían utilizar las dos rutas. Proteínas de estructura compleja posiblemente experimentarían dificultades para ser plegadas por el sistema Tat antes de alcanzar el exterior celular. Adicionalmente, determinadas características de los correspondientes péptidos líderes podrían impedir la secreción por una de las dos rutas, incluso en condiciones de sobreproducción, determinando así la especificidad de la ruta y la proteína, como parece ser el caso de la xilanasas C, transportable sólo vía Tat (Fig.14).

En *S. coelicolor* se han predicho 127 proteínas extracelulares potenciales usuarias de la ruta Tat para su secreción (Schaerlaekens y col. 2004) y sería lógico suponer que la mayoría de ellas tendrían su contrapartida en *S. lividans*. La secuencia anotada del genoma de *S. coelicolor* incluye 819 proteínas extracelulares, de las cuales tan sólo 27, además de agarasa y xilanasas C han sido confirmadas experimentalmente como usuarias de la ruta Tat (Widdick y col., 2006). De ellas, al menos 12 no tienen posibilidad de formar puentes disulfuro (contienen una o ninguna cisteína) y otras cuatro serían potencialmente capaces de formar como máximo un único puente disulfuro. El tamaño molecular no parece ser un obstáculo para que la secreción tenga lugar por la vía Tat, y, casi parece que pueda estar favorecido, ya que 19 de las 27

proteínas tienen longitudes cercanas o superiores a los 500 aa y superan los 1000 aa en dos casos. Todas las proteínas Tat conteniendo una o ninguna cisteína poseen pesos moleculares grandes con excepción de dos de ellas que no alcanzan 400 residuos de longitud. Aunque la región madura de agarasa ha sido utilizada como testigo de la actividad de péptidos líderes para exportar proteínas por la ruta Tat (Widdick y col., 2006), la capacidad de todos y cada uno de esos péptidos líderes para canalizar vía Sec proteínas específicas de la ruta Sec, como  $\alpha$ -amilasa, particularmente en condiciones de sobreproducción, no ha sido todavía comprobada experimentalmente. Quizá no fuera sorprendente que algunas de las proteínas Tat de potencial baja complejidad estructural fueran exportables bajo la directriz de su propio péptido líder en un entorno genético deficiente en TatC, como ocurre con la agarasa, o bajo la directriz de un péptido líder de alguna proteína Sec. En esos casos, seguramente parte de su actividad extracelular, si no toda, sería recuperable gracias a la acción de la foldasa tipo FKBP, como ocurre con agarasa. Es sorprendente que una mutación en el gen de la foldasa, que es una lipoproteína aparentemente exportada por la ruta Tat, sea dispensable (Thompson y col., 2010) y no se haya descrito un fenotipo asociado aunque éste se manifieste de forma transitoria, como ocurre en el caso del mutante en *lsp*. El hecho aparente de que la ruta Tat parezca funcionar preferentemente en estados de crecimiento tardíos podría, de alguna forma enmascarar la acción de FkpA, ya que sólo podría actuar sobre las proteínas Sec que se sintetizasen y secretasen en esos momentos fisiológicos. Es evidente que aún queda investigación por realizar para comprender cómo el correcto plegado de proteínas extracelulares tiene lugar en bacterias del género *Streptomyces*, de forma que bacterias reconocidas como eficientes secretoras de proteínas extracelulares asegurasen la correcta estabilidad y actividad de las proteínas secretadas.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- 1- La deficiencia en Lsp no afecta a la esporulación.
- 2- La deficiencia en Lsp provoca un retraso en el crecimiento en medio definido líquido.
- 3- La propagación en multicopia del gen *lsp* restituye un normal crecimiento en medio definido líquido.
- 4- La depleción de *lsp* provoca un estrés celular temporal donde resulta disminuida la expresión de genes ribosomales y proteínas extracelulares.
- 5- El estrés celular temporal debido a la mutación en *lsp* viene mediado por la inducción, al menos parcial, de la “stringent response”.
- 6- La agarasa puede utilizar las rutas de secreción Sec y Tat en condiciones de sobreproducción.
- 7- La secreción de agarasa vía Sec ocurre en menor cantidad que por la ruta Tat.
- 8- La agarasa secretada por la ruta Sec es activa.
- 9- La presencia en multicopia de la foldasa FkpA parece mejorar la producción de agarasa con el consiguiente aumento de su actividad extracelular.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Alami M, Lüke I, Deitermann S, Eisner G, Koch HG, Brunner J, Müller M.** (2003). "Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*." *Mol. Cell.* 12: 937–46.
- Altschul SF, Madden TL, et al.** (1997). "Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- Baars L, Ytterberg AJ, Drew D, Wagner S, Thilo C, van Wijk KJ, de Gier JW.** (2005). "Defining the Role of the *Escherichia coli* Chaperone SecB Using Comparative Proteomics." *JBC.* 281(15): 10024-10034.
- Bernfeld P.** (1955). "Amylases, alpha and beta." *Meth Enzymol.* 1: 149-158.
- Berks BC, Sargent F y Palmer T.** (2000). "The Tat protein export pathway". *Mol Microbiol.* 35: 260-274.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S.** (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." *J Mol Biol.* 340(4): 783-95.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA.** (2002). "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Nature.* 417(6885):141-7.
- Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schonert BE.** (1992). "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp." *Gene.* 116(1): 43-9.
- Binnie C, Jenish D, Cossar D, Szabo A, Trudeau D, Krygsman P, Malek LT, Stewart DIH.** (1997). "Expression and Characterization of Soluble Human Erythropoietin Receptor Made in *Streptomyces lividans*66." *Prot Express Purif.* 11(3): 271-278.
- Blanco J, Coque JJ, Martin JF.** (1996). "Characterization of the secA gene of *Streptomyces lividans* encoding a protein translocase which complements and *Escherichia coli* mutant defective in the ATPase activity of SecA." *Gene.* 176(1-2): 61-5.
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y.** (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." *Science.* 277(5331): 1453-74.
- Blaudeck N, Kreutzenbeck P, Müller M, Sprenger GA, Freudl R.** (2005). "Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient tat-dependent protein translocation in the absence of TatB." *J Biol Chem.* 280(5): 3426-32.
- Bogsch EG, Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Robinson C, Palmer T.** (1998). "An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria." *J Biol Chem.* 273: 18003–18006.

- Bradford M.** (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Buchanan G, de Leeuw E, Stanley NR, Wexler M, Berks BC, Sargent F, Palmer T.** (2002). "Functional complexity of the twin-arginine translocase TatC component revealed by site-directed mutagenesis." *Mol. Microbiol.* 43: 1457-70.
- Chakraborty R, Bibb M.** (1997). "The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation." *J Bacteriol.* 179(18): 5854-61.
- Champness WC, Chater KF.** (1994). "Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* spp." *Regulation of Bacterial Differentiation.* (Piggot P., Moran C.P.J. and Youngman P., ed.) Washington D.C., American Society for Microbiology: 61-93.
- Chater KF.** (1984). "Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*." *Microbial Development*, Shapiro, L. y Losick, R. (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 89-115.
- Chávez A, Forero A, Sánchez M, Rodríguez-Sanoja R, Mendoza-Hernández G, Servín-Gonzalez L, Sánchez B, García-Huante Y, Rocha D, Langley E, Ruiz B, Sánchez S.** (2011). "Interaction of SCO2127 with BldKB and its possible connection to carbon catabolite regulation of morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*." *Appl Microbiol Biotechnol.* 89(3): 799-806.
- Cline K, Mori H.** (2001). "Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport" *J Cell Biol.* 154:719-29.
- Cristobal S, Scotti P, Lührink J, von Heijne G, de Gier JW.** (1999). "The signal recognition particle-targeting pathway does not necessarily deliver proteins to the Sec-translocase in *Escherichia coli*." *J Biol Chem.* 274(29): 20068-20070.
- Danese PN, Silhavy TJ.** (1998). "Targeting and assembly of periplasmic and outer membrane proteins in *Escherichia coli*". *Annu Rev Genet.* 32: 59-94.
- Datsenko KA, Wanner BL.** (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(12): 6640-5.
- Davis JM, Boswell BA, Bachinger HP.** (1989). "Thermal stability and folding of type IV procollagen and effect of peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase on the folding of the triple helix." *J Biol Chem.* 264: 8956-8962.
- De Buck E, Lammertyn E, Anné J.** (2008). "The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence." *Trends Microbiol.* 16(9): 442-53.
- de Gier JW, Mansournia P, Valent QA, Phillips GJ, Lührink J, von Heijne G.** (1996). "Assembly of a cytoplasmic membrane protein in *Escherichia coli* is dependent on the signal recognition particle." *FEBS Lett.* 399(3): 307-9.
- de Keersmaecker S, Van Mellaert L, Lammertyn E, Vrancken K, Anné J, Geukens N.** (2005). "Functional analysis of TatA and TatB in *Streptomyces lividans*." *Biochem Biophys Res Commun.* 335(3): 973-82.
- de Keersmaecker S, Vrancken K, Van Mellaert L, Anne J y Geukens N.** (2007). "The Tat pathway in *Streptomyces lividans*: interaction of Tat subunits and their role in translocation." *Microbiology.* 153: 1087-1094.

- de Keyzer J, van der Does C, Driessen AJM.** (2003). "The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex." *Cellular and molecular life Sciences* 60(10): 2034-2052.
- de Leeuw E, Granjon T, Porcelli I, Alami M, Carr SB, Müller M, Sargent F, Palmer T, Berks BC.** (2002). "Oligomeric properties and signalpeptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes." *J Mol Biol.* 322:1135–46.
- Denis F, Brzezinski R.** (1992) "A versatile shuttle cosmid vector for use in *Escherichia coli* and actinomycetes." *Gene.* 111(1): 115-118.
- Di Berardo C, Capstick DS, Bibb MJ, Findlay KC, Buttner MJ, Elliot MA.** (2008). "Function and Redundancy of the Chaplin Cell Surface Proteins in Aerial Hypha Formation, Rodlet Assembly, and Viability in *Streptomyces coelicolor*." *J Bacteriol.* 190(17): 5879-5889.
- Ding Z, Christie PJ.** (2003). "*Agrobacterium tumefaciens* twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion." *J Bacteriol.* 185: 760–771.
- Dowson RMC, Elliott DC, Elliot WH, and Jones KM.** (1969). "Data for Biochemical Research." Oxford Univ Press. USA.
- Dygert S, Li L, Florida D, Thoma JA.** (1965). "Determination of reducing agar with improved precision." *Anal Biochem.* 13: 367-374.
- Economou A, Wickner W.** (1994). "SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion". *Cell.* 78(5): 835-43.
- Eijlander RT, Jongbloed JD, Kuipers OP.** (2009). "Relaxed Specificity of the *Bacillus subtilis* TatAdCd Translocase in Tat-Dependent Protein Secretion." *J Bacteriol.* 191(1): 196-202.
- Escutia MR, Val G, Palacín A, Geukens N, Anné J, Mellado RP.** (2006). "Compensatory effect of the minor *Streptomyces lividans* type I signal peptidases on the SipY major signal peptidase deficiency as determined by extracellular proteome analysis." *Proteomics.* 6(14): 4137-4146.
- Eser M, Ehrmann M.** (2003). "SecA dependent quality control of intracellular protein localization." *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(23): 13231-13234
- Fekkes P, de Wit JG, van der Wolk JP, Kimsey HH, Kumamoto CA, Driessen AJ.** (1998). "Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the co-operative binding of SecB and the signal sequence to SecA." *Mol Microbiol.* 29(5): 1179-90.
- Fischer G, Bang H, Mech C.** (1984). "Detection of enzyme catalysis for *cis-trans*-isomerisation of peptide bonds using proline-containing peptides as substrates". *Biochim Biophys Acta.* 43: 1101–1111.
- Freskgard PO, Bergenhem N, Jonsson BH, Svensson M, Carlsson U.** (1992). "Isomerase and chaperone activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase." *Science.* 258: 466–468.
- Gauthier C, Li H, Morosoli R.** (2005). "Increase in xylanase production by *Streptomyces lividans* through simultaneous use of the Sec and Tat- dependent protein export systems." *Appl. Environ Microbiol.* 71(6):3085-3092
- Gennity J, Godlstein J, Inouye M.** (1990). "Signal peptides mutants of *E.coli*" *J. bioenergy. Biomembr.* 22:233-269



- Gilbert M, Ostiguy S, Kluepfel D, Morosoli R.** (1996). "Cloning of a secA homolog from *Streptomyces lividans* 1326 and overexpression in both *S. lividans* and *Escherichia coli*." *Biochim Biophys Acta*. 1296(1): 9-12.
- Gilbert M, Morosoli R, Shareck F, Kluepfel D.** (1995). "Production and secretion of proteins by streptomycetes." *Crit Rev Biotechnol*. 15: 13-39.
- Gohlke U, Pullan L, McDevitt CA, Porcelli I, de Leeuw E, Palmer T, Saibil HR, Berks BC.** (2005). "The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 10482-86.
- González ET, Brown DG, Swanson JK, Allen C.** (2007). "Using the *Ralstonia solanacearum* Tat secretome to identify bacterial wilt virulence factors." *Appl Environ Microbiol*. 73: 3779-3786.
- Gordon ND, Ottaviano GL, Connell SE, Tobkin GV, Son CH, Shterental S, Gehring AM.** (2008). "Secreted-protein response to sigmaU activity in *Streptomyces coelicolor*." *J Bacteriol*. 190(3): 894-904.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W.** (2000). "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." *Electrophoresis*. 21(6):1037-1053.
- Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF.** (2003). "PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin." *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(4): 1541-1546.
- Gust B, Keiser T, Chater KF.** (2002). "Redirect technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*." Jonh Innes Centre. Norwich. UK.
- Hanahan D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol*. 166(4): 557-580.
- Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL.** (1989). "A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase." *Nature*. 341(6244): 758-60.
- Hayashi S, Wu HC.** (1990). "Lipoproteins in bacteria." *J. Bioenerg Biomembr*. 22: 451-471.
- Hesketh A, Chen WJ, Ryding J, chang S, Bibb M.** (2007). "The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Genome Biol*. 8(8): R161.
- Hopwood DA, Kieser T, Wright HM, Bibb MJ.** (1983). "Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans*." *J Gen Microbiol*. 129(7): 2257-69.
- Hutchings M, Palmer T, Harrington DJ, Sutcliffe IC.** (2008). "Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em" *Trends in microbiology*. 17(1):13-21
- Inoue H, Nojimab H, Okayama H.** (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids" *Gene*. 96 (1): 23-28
- Ikeda H, Kotaki H, Omura S.** (1987). "Genetic studies of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*." *J Bacteriol*. 169(12): 5615-21.
- Isiegas C.** (1999). "Regulación temporal de la secreción en *Streptomyces lividans*:  $\alpha$ -amilasa y agarasa." Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias.
- Kang CB, Hong Y, Dhe-Paganon S, Yoon HS.** (2008). "FKBP family proteins: Immunophilins with Versatile Biological Functions." *Neurosignals*. 16: 318-325.

- Keiser T, M J. Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA.** (2000). "Practical *Streptomyces* genetics." The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Kiefhaber T, Quaas R, Hahn U, Schmid FX.** (1990). "Folding of ribonuclease T1.1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization." *Biochemistry*. 29: 3053–3061.
- Kim SO, Suh JW.** (1997). "Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the *secE* gene from *Streptomyces lividans* TK24." *Sanop Misaengmul Hakhoe Chi*. 25 (39): 253-257.
- Kirby KS, Fox-Carter E, Guest M.** (1967). "Isolation of deoxyribonucleic acid and ribosomal ribonucleic acid from bacteria." *Biochem J*. 104: 258-62.
- Koch HG, Hengelage T, Neumann-Haefelin C, MacFarlane J, Hoffschulte HK, Schimz KL, Mechler B, Muller M.** (1999). "In vitro studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of *Escherichia coli*." *Mol Biol Cell*. 10(7):2163-73.
- Kojima S, Kumagai I, Miura K.** (1990). "Effect of inhibitory activity of mutation at reaction site P4 of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor, SSI." *Protein Eng*. 3(6): 527-530.
- Lang K, Schmid FX, Fischer G.** (1987). "Catalysis of protein folding by prolyl isomerase." *Nature*. 329: 268–270.
- Lee PA, Tullman-Ercek D, Georgiou G.** (2006). "The bacterial twin-arginine translocation pathway." *Annu Rev Microbiol*. 60: 373-95.
- Leskelä S, Wahlstrom E, Kontinen VP, Sarvas M.** (1999). "Lipid modification of prelipoproteins is dispensable for growth but essential for efficient protein secretion in *Bacillus subtilis*: characterization of the *lgt* gene." *Mol Microbiol*. 31(4): 1075-1085.
- Lin LN, Hasumi H, Brandts JF.** (1988). "Catalysis of proline isomerization during protein-folding reactions". *Biochim Biophys Acta*. 956: 256–266.
- Madigan M, Martinko J, Parker J.** (1999). Brock. "Biología de los Microorganismos." Prentice Hall. 8ª edición.
- Maldonado B, Kneuper H, Buchanan G, Hatzixanthis K, Sargent F, Berks BC, Palmer T.** (2011). "Characterisation of the membrane-extrinsic domain of the TatB component of the twin arginine protein translocase." *FEBS Lett*. 585(3): 478-84.
- Martínez-Costa OH, Arias P, Romero NM, Parro V, Mellado RP, Malpartida F.** (1996). "A *relA/spoT* homologous from *Streptomyces coelicolor* A3(2) controls antibiotic biosynthetic genes." *J Biol Chem*. 271(18): 10627-10634.
- Miyadoh S.** (1993). "Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach." *Actinomycetologica*. 7: 100-106.
- Mori H, Cline K.** (2002). "A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid ΔpH/Tat translocase." *J Cell Biol*. 157:205-10.
- Muñoz FJ, Miller KW, Beers R, Graham M, Wu HC.** (1991). "Membrane topology of *Escherichia coli* prelipoprotein signal peptidase (signal peptidase II)." *J Biol Chem*. 266: 17667–17672.
- Nakashima N, Mitani Y, Tamura T.** (2005). "Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins." *Micro Cell Factories*. 4: 7-12.
- Nielsen H, Krogh A.** (1998). "Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model." *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. 6: 122-30.

- Norrande J, Kempe T, Messing J.** (1983). "Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide directed mutagenesis." *Gene*. 26(1): 101-106.
- Olivier, D.** (1985). "Protein secretion in *E. coli*". *Annu.Rev. Microbiol.* 39: 615-648
- Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B.** (2005). "Protein translocation by the Sec61/SecY channel." *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21: 529-50.
- Ostiguy S, Gilbert M, Shareck F, Kluepfel D, Morosoli R.** (1996). "Cloning and sequencing of the secY homolog from *Streptomyces lividans* 1326." *Gene*. 176(1-2): 265-7.
- Pahl A, S  ller U.** (1992). "FK-506-binding proteins from streptomycetes producing immunosuppressive macrolactones of the FK-506 type." *J Bacteriol.* 174(18): 5888– 5894
- Palacín A, Parro V, Geukens N, Anne J, Mellado RP.** (2002). "SipY Is the *Streptomyces lividans* type I signal peptidase exerting a major effect on protein secretion." *J Bacteriol.* 184(17): 4875-80.
- Palacín A.** (2002). "Caracterización funcional de las cuatro peptidasas señal tipo I de *Streptomyces lividans* TK21." Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias.
- Palmer T, Sargent F, Berks BC.** (2005). "Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway." *Trends Microbiol.* 13(4):175-80.
- Palomino C, Mellado RP.** (2005). "The *Streptomyces lividans* cytoplasmic signal recognition particle receptor FtsY is involved in protein secretion." *J mol microbial biotech.* 9(1): 57-62.
- Palomino C, Mellado RP.** (2008). "Influence of a *Streptomyces lividans* SecG functional analogue on protein secretion" *Int Microbiol.* 11(1): 25-31.
- Pang X, Aigle B, Girardet JM, Mangenot S, Pernodet JL, Decaris B, Leblond P.** (2004). "Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome." *Antimicrob Agents Chemother.* 48(2): 575-88.
- Parro V, Mellado RP.** (1994). "Effect of glucose on agarase overproduction by *Streptomyces*." *Gene*. 145: 49-55.
- Parro V, Mellado RP.** (1998) "A new signal peptidase gene from *Streptomyces lividans* TK21." *DNA Seq.* 9(2): 71-7.
- Pimienta E, Ayala JC, Rodríguez C, Ramos A, Van Mellaert L, Vall  n C, Ann   J.** (2007). "Recombinant production of *Streptococcus equisimilis* streptokinase by *Streptomyces lividans*." *Micro Cell Factories.* 6: 20-25.
- Pimienta E, Vall  n C.** (2005). "Utilización de *Streptomyces* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas." *CENIC (Ciencias Biológicas)*, 36(2): 97-104.
- Pohlschröder M, Hartmann E, Hand NJ, Dilks K, Haddad A.** (2005) "Diversity and evolution of protein translocation." *Annu Rev Microbiol.* 59: 91-111.
- Pohlschröder M, Prinz WA, Hartmann E, Beckwith J.** (1997). "Protein translocation in the three domains of life: Variations on a theme" *Cell.* 91(5): 563-566.
- Pop OI, Westermann M, Volkmer-Engert R, Schulz D, Lemke C, Schreiber S, Gerlach R, Wetzker R, M  ller JP.** (2003). "Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatA(d) indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*." *J biol chem.* 278(40): 38428-38436.
- Pradel N, Ye C, Livrelli V, Xu J, Joly B, Wu LF.** (2003). "Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Infect. Immun.* 71: 4908–4916.

- Prágai Z, Tjalsma H, Bolhuis A, van Dijk J M, Venema G, Bron S.** (1997). "The signal peptidase II (lsp) gene of *Bacillus subtilis*." *Microbiology*. 143: 1327–1333.
- Pugsley AP.** (1993). "The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria." *Microbiol Rev*. 57(1): 50-108.
- Rabilloud T.** (1998). "Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis." *Electrophoresis*. 19(5): 758-760.
- Rahfeld JU, Rücknagel KP, Stoller G, Horne SM, Schierhorn A, Young KD, Fischer G.** (1996). "Isolation and amino acid sequence of a new 22-kDa FKBP-like peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase of *Escherichia coli*. Similarity to Mip-like proteins of pathogenic bacteria." *J Biol Chem*. 271(36): 22130-8.
- Rahfeld JU, Rücknagel KP, Schelbert B, Ludwig B, Hacker J, Mann K, Fischer G.** (1994). "Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin." *FEBS Lett*. 352(2): 180-184.
- Rahfeld JU, Schierhorn A, Mann K, Fischer G.** (1994). "A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*." *FEBS Lett*. 343(1): 65-69.
- Rahman O, Cummings SP, Harrington DJ, Sutcliffe IC.** (2008). "Methods for the bioinformatic identification of bacterial lipoproteins encoded in the genomes of Gram positive bacteria." *World J Microbiol Biotechnol*. 24: 2377–2382.
- Redenbach M, Kieser HM, Denapate D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, and Hopwood DA.** (1986). "A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome." *Mol. Microbiol*. 21: 77-96.
- Rezwan M, Grau T, Tschumi A, Sander P.** (2007). "Lipoprotein synthesis in mycobacteria" *Microbiology*. 153 (Pt 3):652-658
- Rudd KE, Sofia HJ, Koonin EV, Plunkett G 3rd, Lazar S, Rouviere PE.** (1995). "A new family of peptidyl-prolyl isomerases." *Trends Biochem Sci*. 20(1): 12-4.
- Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T.** (1989). "Molecular cloning. A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sankaran K, Gupta SD, Wu HC.** (1995.) "Modification of bacterial lipoproteins." *Methods Enzymol*. 250, 683–697.
- Santini CL, Ize B, Chanal A, Muller M, Giordano G, Wu LF.** (1998). "A novel Sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*." *EMBO J*. 17: 101-112.
- Sargent F, Gohlke U, De Leeuw E, Stanley NR, Palmer T, Saibil HR, Berks BC.** (2001). "Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure" *Eur J Biochem*. 268: 3361-3367.
- Schaerlaekens K, Schierova M, Lammertyn E, Geukens N, Anne J y Van Mellaert L.** (2001). "Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*." *J Bacteriol*. 183(23): 6727-6732.
- Schaerlaekens K, Van Mellaert L, Lammertyn E, Geukens N, Anné J.** (2004). "The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in tat deletion mutants and genome analysis." *Microbiology*. 150(Pt 1): 21-31.
- Seto H, T Sasaki, S. Imai, T. Tsuruoka, H. Ogawa, A. Satoh, S. Inouye, T. Niida, and N. Otake.** (1983). "Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293). 2. Isolation of the first natural products with a C-P-H bond and their involvement in the C-P-C bond formation." *J. Antibiot*. 36: 96-98.

- Shin SK, Park HS, Kwon HJ, Yoon HJ, Suh JW.** (2007). "Genetic characterization of two S-adenosylmethionine-induced ABC transporters reveals their roles in modulations of secondary metabolism and sporulation in *Streptomyces coelicolor* M145." *J Microbiol Biotechnol.* 17(11): 1818-25.
- Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH.** (1989). "A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK-506 has peptidyl-prolylisomerase activity but is distinct from cyclophilin." *Nature.* 341:755
- Smith BW, Roe JH.** (1949) "A photometric method for the determination of alpha-amylase in blood and urine, with use of the starch-iodine color". *Journal of Biological Chemistry.* 179(1): 53-59
- Smyth GK.** (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." *Stat Appl Genet Mol Biol.* 3: Article3.
- Sutcliffe IC, Hutchings MI.** (2007). "Putative lipoproteins identified by bioinformatic genome analysis of *Leifsonia xyli* ssp *xyli*, the causative agent of sugarcane ratoon stunting disease." *Molr Plant Pathol.* 8: 121-128.
- Tan YJ, Oliveberg M, Otzen DE, Fersht AR.** (1997). "The rate of isomerisation of peptidyl-proline bonds as a probe for interactions in the physiological denatured state of chymotrypsin inhibitor." *J Mol Biol.* 269: 611–622.
- Takano E, Bibb MJ.** (1994). "The stringent response ppGpp and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Actinomycetol.*, 8: 1-16.
- Tarry MJ, Schäfer E, Chen S, Buchanan G, Greene NP, Lea SM, Palmer T, Saibil HR, Berks BC.** (2009). "Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system." *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(32):13284-9.
- Thompson CJ, Ward JM, Hopwood DA.** (1980). "DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species." *Nature.* 286: 525-527.
- Thompson BJ, Widdick DA, Hicks MG, Chandra G, Sutcliffe IC, Palmer T, Hutchings MI.** (2010). "Investigating lipoprotein biogenesis and function in the model Gram-positive bacterium *Streptomyces coelicolor*" *Mol Microbiol.* 77(4): 943-957.
- Tjalsma H, Zanen G, Venema G, Bron S, van Dijl J M.** (1999). "The potential active site of the lipoprotein-specific (type II) signal peptidase of *Bacillus subtilis*." *J Biol Chem.* 274: 28191–28197.
- Tjalsma H, van den Dolder J, Meijer WJ, Venema G, Bron S, van Dijl JM.** (1999). "The plasmid-encoded signal peptidase SipP can functionally replace the major signal peptidases SipS and SipT of *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* 181(8): 2448-2454
- Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, van Dijl JM.** (2000). "Signal peptide dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome." *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(3): 515-47.
- Tullman-Ercek D, DeLisa MP, Kawarasaki Y, Iranpour P, Ribnicky B, Palmer T, Georgiou G.** (2007). "Export Pathway Selectivity of *Escherichia coli* Twin Arginine Translocation Signal Peptides." *J Biol Chem.* 282(11): 8309-8316
- van Roosmalen ML, Jongbloed JD, de Jonf A, van Eerden J, Venema G, Bron S, van Dijl JM.** (2001). "Detergent independent in vitro activity of a truncated *Bacillus* signal peptidase." *Microbiology.* 147: 909-917.
- van Wely KH.** (2000) "The general protein secretion pathway of *Bacillus subtilis*." Tesis doctoral, Rijksuniversiteit de Groningen.

- van Wely KH, Swaving J, Freudl R, Driessen AJ. (2001). "Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria." *FEMS Microbiol Rev.* 25: 437-454.
- Vitikainen M, Lappalainen I, Seppala R, Antelmann H, Boer H, Taira S, Savilahti H, Hecker M, Vihinen M, Sarvas M, Kontinen VP. (2004). "Structure-Function Analysis of PrsA reveals roles for the parvulin-like and flanking N- and C- terminal Domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*" *J Biol Chem.* 18(30): 19302-19314.
- von Heijne G. (1990). "The signal peptide." *J Membr Biol.* 115(3): 195-201.
- Vasanta N, Freese E. (1980) "Enzyme changes during *B.subtilis* sporulation caused by deprivation of guanine nucleosides". *J. Bacteriol.* 144: 1119-1125.
- Ward JM, Janssen GR, Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Bibb MJ. (1986). "Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator." *Mol Gen Genet.* 203(3): 468-78.
- Widdick DA, Dilks K, Chandra G, Bottrill A, Naldrett M, Pohlschröder M, Palmer T. (2006). "The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(47):17927-17932
- Wiley J, Schwedock J, Losick R. (1993). "Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*." *Genes Dev.* 7(5): 895-903.
- Williams ST, Sharpe ME, Holt JG. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Winkins, Baltimore, Maryland.
- Yang Y, Park YD, Yu TW, Zhou HM. (1999). "Reactivation and refolding of a partially folded creatine kinase modified by 5,5\_-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)." *Biochem Biophys Res Commun.* 259: 450-454.
- Yasumura A, Abe S, Tanaka T. (2008). "Involvement of nitrogen regulation in *Bacillus subtilis* degU expression." *J Bacteriol.* 190(15): 5162-5171.
- Zaballos A, Salas M, Mellado RP. (1987.) "A set of expression plasmid for the synthesis of fused and unfused polypeptides in *Escherichia coli*." *Gene.* 58: 67-76.
- Zhong Z, Caspi R, Mincer T, Helinski D, Knauf V, Boardman K, Wilkinson JE, Shea T, DeLoughery C, Toukdarian AA (2002). "50-kb plasmid rich in mobile gene sequences isolated from a marine micrococcus" *Plasmid.* 47(1): 1-9.